

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΠΑΤΡΩΝ  
UNIVERSITY OF PATRAS

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ Ζωικής Παραγωγής, Αλιείας και  
Υδατοκαλλιεργειών

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Βιώσιμη Αλιεία, Υδατοκαλλιέργεια»

Διπλωματική Εργασία

Ανοσοβιολογική απόκριση των ψαριών μετά από εμβολιασμό μέσω τροφής (*oral vaccination*) - Μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα της μεθόδου στις ιχθυοκαλλιέργειες

ΜΠΟΥΡΣΙΑΚΗ ΒΑΓΙΑ (ΑΜ:1089669)

Εισηγητής: Κωνσταντίνος Πούλος (ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ)

ΜΕΣΟΛΟΓΓΙ 2022

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα υδάτινα προϊόντα όπως τα ψάρια και τα οστρακοειδή είναι υψηλής πρωτεϊνικής σημασίας εδώδιμα προϊόντα και περιέχουν μεγάλη ποικιλία θρεπτικών συστατικών άκρως απαραίτητων για τη σωστή διατήρηση της ανθρώπινης υγείας. Η ραγδαία εξάπλωση των υδατοκαλλιεργειών, οι υψηλές πυκνότητες και άλλες τεχνητές συνθήκες στις οποίες τα ψάρια καλλιεργούνται, οδηγούν σε εκθετική αύξηση των κινδύνων έξαρσης λοιμωδών νοσημάτων. Η χρήση των αντιβιοτικών δεν έφερε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, οδηγώντας σε αλόγιστη χρήση για την επίτευξη του επιθυμητού σκοπού, η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε εξαιρετικά ανθεκτικά βακτηριακά στελέχη. Συνεπώς, για την εξασφάλιση της βιωσιμότητας των μονάδων υδατοκαλλιέργειας, και κατά συνέπεια την επέκτασή τους, κρίνεται απαραίτητος ο εμβολιασμός των ψαριών. Ο εμβολιασμός έχει αποδειχτεί πως είναι ιδιαίτερα αποδοτικός και ασφαλής, προστατεύοντας τα ψάρια από τις ασθένειες με το ελάχιστο οικολογικό αποτύπωμα και την εφαρμοσιμότητά του σε όλα τα καλλιεργούμενα είδη.

Σκοπός της εργασίας είναι η αξιολόγηση της δια του στόματος χορήγησης του εμβολίου (oral vaccination) σε ψάρια αλμυρού νερού όπως το λαβράκι, η τσιπούρα και ο σολομός Ατλαντικού. Η oral μέθοδος προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα όπως η εύκολη εφαρμογή της, η βελτίωση της ασφάλειας των ιχθύων και του περιβάλλοντος, η σημαντική μείωση του stress καθώς επίσης και ο γρήγορος εμβολιασμός μεγάλου αριθμού ψαριών με μειωμένο κόστος. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει πως ο παρεντερικός εμβολιασμός ενώ διεγείρει ικανοποιητικά τη συστηματική ανοσοβιολογική αντίδραση δεν επάγει με επιτυχία την αντίστοιχη βλεννογονική, σε αντίθεση με την oral χορήγηση που διεγείρει και τους δύο τύπους ανοσοβιολογικής αντίδρασης. Παράλληλα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον αρχικό εμβολιασμό ή σαν αναμνηστική δόση.

## **ABSTRACT**

Aquatic products including fishes and crustaceans are excellent animal protein sources and contain a great variety of nutrients which are essential for humans. Since the rapid advance of aquaculture, the high densities and other artificial conditions in which fish are farmed exponentially increase the risks of outbreaks from infectious diseases. The use of antibiotics has not delivered the expected results, leading to their excessive use, which could eventually lead to extremely resistant bacterial strains. Consequently, to secure the sustainability and expansion of global aquaculture production, fish vaccination has been proven highly effective and safe, protecting fish from diseases with minimal ecological impact and being applicable to all species of farmed fishes.

The aim of this study is the assessment of oral vaccination process oriented to saltwater fishes such as sea bream, gilthead sea bream and Atlantic salmon. Oral vaccination is offering significant advantages such as effortless application, improved safety, substantial reduction of stress as well as the possibility of the rapid vaccination of many fishes with reduced costs. Furthermore, studies show that parenteral vaccination efficiently stimulates systemic responses but is a poor inducer of mucosal immunity, whereas oral administration results in stimulation of both responses. Oral vaccines can be administered for primary vaccination or as a booster one.

<b>1. ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1 Όργανα ανοσοποίησης</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2 Κυριότερα χαρακτηριστικά και λειτουργική οργάνωση ανοσοβιολογικού συστήματος</b> .....	<b>5</b>
<b>1.3 Μη ειδικό ή Φυσικό ανοσοβιολογικό σύστημα</b> .....	<b>6</b>
<b>1.4 Εξειδικευμένο ή επίκτητο ανοσοβιολογικό σύστημα</b> .....	<b>8</b>
<b>1.5 Γενικές αρχές</b> .....	<b>10</b>
<b>2. ΕΜΒΟΛΙΑ</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1 Ιστορική αναδρομή</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2 Σκοπός του εμβολιασμού</b> .....	<b>11</b>
<b>2.3 Αποτελεσματικότητα των εμβολίων</b> .....	<b>12</b>
<b>2.4 Μηχανισμός δράσης των εμβολίων</b> .....	<b>13</b>
2.4.1 Εμβόλια με αδρανοποιημένους μικροοργανισμούς (Killed vaccines) .....	13
2.4.2 Εμβόλια με εξασθενημένους μικροοργανισμούς (Live – Attenuated vaccines) .....	14
2.4.3 Εμβόλια υπομονάδων (Subunit vaccines).....	14
2.4.4 Εμβόλια νουκλειικών οξέων (DNA vaccines) .....	15
<b>2.5 Κατακλείδα</b> .....	<b>16</b>
<b>3. ΤΡΟΠΟΙ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΕΜΒΟΛΙΩΝ</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1 Μέθοδος της εμβάπτισης</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2 Μέθοδος με ενδοπεριτοναϊκή/ενδομυϊκή έγχυση</b> .....	<b>19</b>
<b>3.3 Μέθοδος χορήγησης από το στόμα</b> .....	<b>20</b>
<b>4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗΣ / ΑΝΟΣΟΕΝΙΣΧΥΤΙΚΑ / ΦΟΡΕΙΣ ΕΜΒΟΛΙΩΝ</b> .....	<b>22</b>
<b>4.1 Ανοσοενισχυτικά / Adjuvants</b> .....	<b>22</b>

4.2 Φορείς εμβολίων / <i>Vaccine carriers</i> .....	23
4.3 Τεχνικές ενθυλάκωσης / <i>Encapsulation techniques</i> .....	24
5. ΠΑΘΟΓΟΝΑ / ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ .....	25
5.1 Ιογενής εγκεφαλοπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια ή ιογενής νευρική νέκρωση / <i>Viral encephalopathy and retinopathy (VER) or Nervous necrosis virus (NNV)</i> .....	25
5.2 Λοιμώδης αναιμία του σολομού / <i>Infectious salmon anemia (ISA)</i> .....	25
5.3 Λοιμώδης παγκρεατική νέκρωση / <i>Infectious pancreatic necrosis (IPN)</i> .....	26
5.4 Εντερική ερυθροστοματίτιδα / <i>Enteric redmouth disease</i> .....	27
5.5 <i>Salmon rickettsial septicaemia (SRS)</i> .....	27
6. ORAL VACCINATION .....	28
6.1 Μελέτες .....	28
6.2 Σύνοψη .....	53
7. DISCUSSION .....	57
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	59

## 1. ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το ανοσοβιολογικό ως σύστημα είναι χαρακτηριστικό των σπονδυλωτών, τα ασπόνδυλα ως οργανισμοί μπορεί να διαθέτουν μόνον υποτυπώδεις μηχανισμούς εξελιγμένης άμυνας απέναντι σε βιοπαθογονικές απειλές. Στους ιχθείς υπάρχει ποικιλότητα, αλλά και σημαντικές διαφορές από τα θηλαστικά, με γενικά πιο πρωτόγονα συστήματα (που οφείλονται στην ποικιλοθερμία τους) αλλά και με αρκετές αναλογίες και ομοιότητες. Δομικά, το ανοσοβιολογικό σύστημα των τελεόστεων συγκροτείται από πληθυσμούς κυττάρων, ιστούς και όργανα με παράλληλο αιμοποιητικό ρόλο αποκαλούμενα «λεμφοειδή».

Το ανοσοβιολογικό σύστημα είναι ένα από τα σημαντικότερα συστήματα κάθε ζωντανού οργανισμού που καθορίζει την υγεία του. Η ακεραιότητά του επηρεάζεται κυρίως από την ηλικία, τις ορμονικές δυσλειτουργίες, το «stress» και την εφαρμογή μιας μη ισορροπημένης διατροφής. Το ανοσοβιολογικό σύστημα βρίσκεται στην πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού ενάντια σε ανεπιθύμητους εισβολείς (διάφοροι παθογόνοι μικροοργανισμοί) που ποικίλουν από συνηθισμένους και ήπιους έως και εξαιρετικά σοβαρούς και απειλητικούς για τη ζωή του οργανισμού. Το ανοσοβιολογικό σύστημα προστατεύει έναν οργανισμό από την εισβολή των ιών, των βακτηρίων, των παρασίτων, των μικροβίων, των τοξινών και από όλα τα άλλα είδη μικροοργανισμών (Davidson *et al.*, 1997).

Όταν αναφερόμαστε στο ανοσοβιολογικό σύστημα πρέπει να συνειδητοποιήσουμε ότι είναι πραγματικά ένα δίκτυο, ένα πολύ καλά οργανωμένο σύστημα που στην πραγματικότητα αποτελείται από τα κύτταρα, τους ιστούς, τα όργανα και τις διαδικασίες που λειτουργούν μαζί, για να υπερασπίσουν τον οργανισμό ενάντια στις επιθέσεις από τους ξένους εισβολείς με σκοπό να τους κρατήσει έξω. Αλλά ακόμα και εάν κατορθώνουν να εισβάλουν, το καθήκον του ανοσοβιολογικού συστήματος είναι να τους καταστρέψει (Sahoo *et al.*, 2003). Το ανοσοβιολογικό σύστημα έχει την ικανότητα να αυτορυθμίζεται και βασίζεται σε αντίστοιχες ειδικές γενετικές προδιαγραφές. Όμως η σωστή και επωφελής λειτουργία του δεν είναι πάντοτε δεδομένη και εξαρτάται κυρίως από την γενική κατάσταση του κάθε ατόμου

καθώς και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες διαβιεί, που μπορεί να περιορίζουν ή ακόμη και να διαταράσσουν την ομαλή λειτουργία του.

Το ανοσοβιολογικό σύστημα, επομένως, είναι το σύνολο των βιολογικών στοιχείων που είναι υπεύθυνα για την άμυνα του οργανισμού απέναντι σε εξωτερικές βιολογικές απειλές (δηλ. παθογονικούς μικρο-οργανισμούς) ή εσωτερικές (δηλ. νεοπλασίες). Στην άμυνα του οργανισμού δεν περιλαμβάνονται βιολογικές απειλές θρεπτικού ή κοινωνικού τύπου αλλά ούτε και απειλές και βλάβες από φυσικοχημικούς παράγοντες. Στις φλεγμονικές αντιδράσεις του οργανισμού σε οποιοσδήποτε προκαλούμενες βλάβες, συνήθως συμμετέχουν και στοιχεία του ανοσοβιολογικού συστήματος.

### 1.1 Όργανα ανοσοποίησης

Το λεμφικό σύστημα είναι ένα εξειδικευμένο σύστημα αγγείων και οργάνων, του οποίου το δίκτυο αναπτύσσεται σε όλο το σώμα παράλληλα με το κυκλοφορικό σύστημα με το οποίο συνδέεται. Το λεμφικό σύστημα αποτελείται από τρία βασικά λεμφικά όργανα. Αυτά είναι τα νεφρά, ο σπλήνας, και ο θύμος αδένας.

Ο νεφρός, πέρα από τις αιμοποιητικές λειτουργίες, παρουσιάζει την υψηλότερη παραγωγή Β λεμφοκυττάρων και αποτελεί το υπεύθυνο ανοσοβιολογικό όργανο για το φαινόμενο της φαγοκυττάρωσης, της παραγωγής αντιγόνων, του σχηματισμού των ανοσοσφαιρινών και τη δημιουργία ανοσοβιολογικής μνήμης μέσω των μελανομακροφάγων κέντρων (MMCs). Ο νεφρός είναι ένα απαραίτητο όργανο τόσο για σκοπούς ανοσοβιολογικής αντίδρασης όσο και για ενδοκρινολογικούς.

Η σπλήνα ή ο σπλήνας αποτελείται από ένα σύστημα σπληνικών ελλειψοειδών αγγείων, μελανομακροφάγων κέντρων (MMCs) και λεμφικών ιστών. Τα ελλειψοειδή είναι τριχοειδή αγγεία με πολύ λεπτό τοίχωμα. Τα κύτταρα κατά μήκος των τοιχωμάτων εμπλέκονται ενεργά στη φαγοκύτωση των αντιγόνων. Τα αντιγόνα μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλα χρονικά διαστήματα συνήθως με τη μορφή αντισωμάτων ή μεταβολικών προϊόντων παίζοντας σημαίνοντα ρόλο στην ανοσοβιολογική μνήμη. Το

μέγεθος του σπλήνα χρησιμοποιείται ευρέως ως μία μετρήσιμη παράμετρος ανοσοβιολογικής απόκρισης.

Ο θύμος αδένας είναι ένα ομοιογενές δίλοβο όργανο, μοιάζει με ένα λεπτό οβάλ φύλλο λεμφοειδούς ιστού τοποθετημένο πάνω από τη βραγχιακή κοιλότητα. Παράγει τα T λεμφοκύτταρα τα οποία εμπλέκονται στη διέγερση του φαινομένου της φαγοκυττάρωσης καθώς επίσης και στην παραγωγή αντισωμάτων μέσω των B λεμφοκυττάρων. Ο εκφυλισμός του θύμου αδένος εξαρτάται κυρίως από τους ορμονολογικούς κύκλους και τις εποχικές διακυμάνσεις και λιγότερο από την ηλικία του ψαριού.

## 1.2 Κυριότερα χαρακτηριστικά και λειτουργική οργάνωση ανοσοβιολογικού συστήματος

Τα βασικότερα χαρακτηριστικά του ανοσοβιολογικού συστήματος είναι:

- η ικανότητα να διακρίνει μεταξύ των δικών του και των «ξένων» σε επίπεδο βιομορίων
- η ικανότητα να αντιδρά με συντονισμένο τρόπο έναντι όλων των βιοπαθογονικών απειλών με σκοπό την εξουδετέρωσή τους ώστε να διατηρείται η ομοιόσταση και η καλή υγεία του κάθε οργανισμού διασφαλιζόμενης της «ανοσίας» του έναντι των βιοπαθογονικών απειλών.

Η λειτουργική οργάνωση του ανοσοβιολογικού συστήματος γίνεται σε δύο επίπεδα:

- της εγγενούς ή μη ειδικής ανοσοβιολογικής αντίδρασης, στο οποίο δεν γίνεται κάποια ουσιαστική διάκριση μεταξύ των διαφορετικών τύπων απειλής καθώς αποτελεί την πρώτη «γραμμή άμυνας» απέναντι σε κάθε απειλή, και
- της επίκτητης ή εξειδικευμένης ανοσοβιολογικής αντίδρασης, όπου γίνεται πλήρης διάκριση των απειλών και η κατάλληλη προσαρμογή της έτσι ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή αποτελεσματικότητα στην αντιμετώπιση της κάθε απειλής.
- Η αποτελεσματικότητα της επίκτητης ανοσοβιολογικής αντίδρασης έναντι των απειλών εξαρτάται από τη δραστηριότητα της φυσικής ανοσίας η οποία πάντα

προηγείται χρονικώς αυτής. Η αντίδραση της επίκτητης δεν είναι πάντοτε δεδομένη.

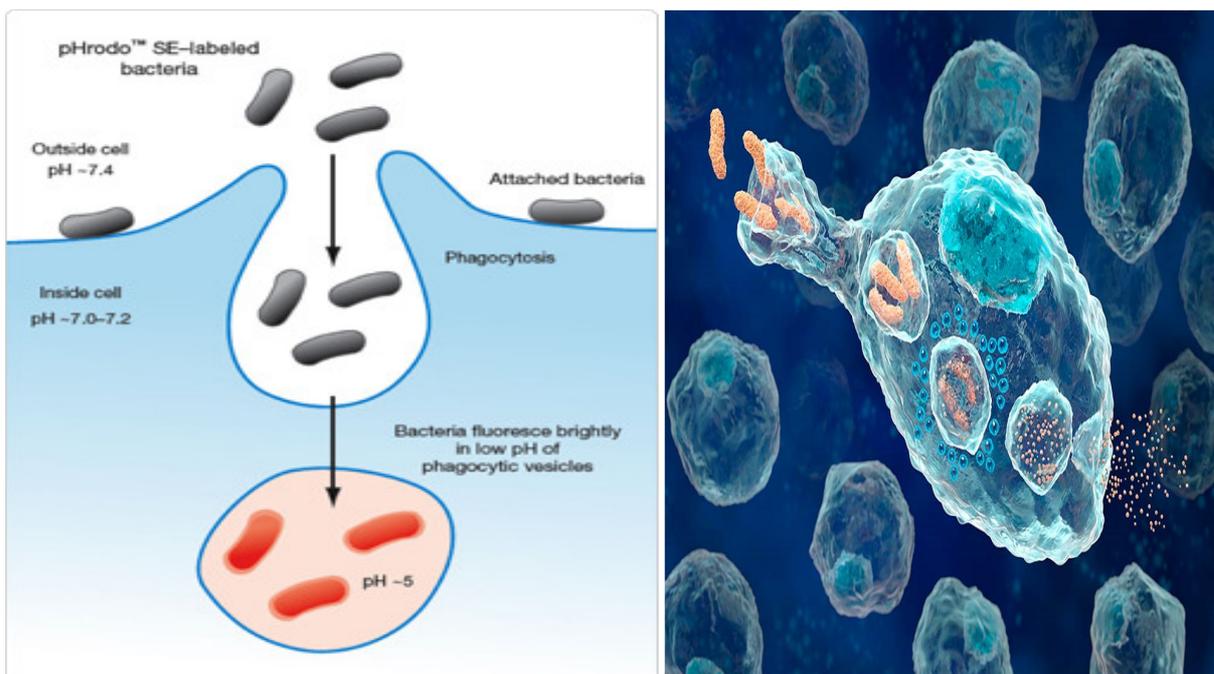
### 1.3 Μη ειδικό ή Φυσικό ανοσοβιολογικό σύστημα

Είναι το σκέλος της άμεσης αντίδρασης, της πρώτης γραμμής άμυνας και περιλαμβάνει συνοπτικά, τα ακόλουθα στοιχεία, τα οποία εμπλέκονται και επιλέγονται από τον οργανισμό κατά περίπτωση στην αντιμετώπιση του κάθε τύπου βιοπαθογονικής απειλής.

- Τα **αντιβακτηριδιακά πεπτίδια** είναι χαμηλού μοριακού βάρους πεπτίδια και έχουν την ικανότητα να προκαλούν τη λύση των βακτηριακών μεμβρανών. Βρίσκονται στη βλέννα, στο συκώτι και στους ιστούς των βραγχίων.
- Η **λυσοζύμη** μπορεί να δράσει στην πεπτιδογλυκάνη του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος προκαλώντας τη λύση του βακτηρίου. Εντοπίζεται στη βλέννα, στον λεμφοειδή ιστό, στο πλάσμα καθώς επίσης και σε άλλα σωματικά υγρά. Η λυσοζύμη συντίθεται κυρίως στο συκώτι και εμπλέκεται σε ένα μεγάλο εύρος αμυντικών μηχανισμών όπως η βακτηριόλυση που αναφέραμε παραπάνω και η οψωνιοποίηση.
- Οι **λεκτίνες** είναι πρωτεΐνες που συγκολλούν τα κύτταρα και επιταχύνουν τα γλυκοσυζεύγματα, δηλαδή την πρόσδεση υδατανθράκων με υψηλή ειδικότητα και συγγένεια. Είναι ικανές να δεσμεύουν συγκεκριμένα σάκχαρα και δρουν ως οψωνίνες για τη φαγοκυττάρωση των βακτηρίων. Εμπλέκονται και στην ενεργοποίηση του συστήματος συμπλήρωμα (complement system).
- Η **C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP)**, ένας χυμικός παράγοντας που ανήκει στις λεγόμενες πρωτεΐνες οξείας φάσης του ανοσοβιολογικού συστήματος. Αυτός είναι ο όρος για τις πρωτεΐνες που απελευθερώνονται όλο και περισσότερο στο αίμα στην περίπτωση οξείας φλεγμονής. Αντιδρά στην φωσφορυλοχολίνη, ένα ευρέως διαδεδομένο στοιχείο των δομών της επιφάνειας των βακτηρίων, στους μύκητες και στα παράσιτα. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες περιορίζουν τη διασπορά των παθογόνων παραγόντων, αδρανοποιούν τα πρωτεολυτικά

ένζυμα, σκοτώνουν τα μικρόβια, επιδιορθώνουν πιθανές ζημιές που έχει υποστεί ο ιστός και άλλα πιθανά παθογόνα. Τα επίπεδα των πρωτεϊνών αυξάνουν στην περίπτωση μόλυνσης ή τραυματισμού. Επομένως, παίζουν σημαντικό ρόλο στο ανοσοβιολογικό σύστημα, ενεργοποιώντας το κλασικό complement pathway, ενισχύουν τη φαγοκυττάρωση και απομακρύνουν τα άτυπα κύτταρα.

- ο Το **συμπλήρωμα** είναι ένα σύστημα πλασματικών πρωτεϊνών (χυμικός παράγοντας). Το σύστημα του συμπληρώματος παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνδεση της έμφυτης και της επίκτητης ανοσοβιολογικής αντίδρασης στα ψάρια. Επομένως, υφίσταται στην εξολόθρευση των παθογόνων μέσω της οψωνινοποίησης και της ενεργοποίησης του φαινομένου της φαγοκυττάρωσης. Συγκεκριμένα, παρουσιάζει βακτηριοκτόνο δράση έναντι των μη λοιμωδών Gram-negative βακτηρίων αλλά όχι έναντι των Gram-positive βακτηρίων ή των λοιμωδών Gram-negative. Χημικές ενώσεις όπως οι πολυσακχαρίτες στα κυτταρικά τοιχώματα των Gram-negative βακτηρίων ενεργοποιούν άμεσα το συμπλήρωμα που μπορεί να οδηγήσει στη λύση αυτών. Αυτή τη στιγμή εκτιμάται πως το συμπλήρωμα αποτελεί μία λειτουργική γέφυρα μεταξύ της φυσικής και της επίκτητης ανοσίας που επιτρέπει μία ολοκληρωτική άμυνα του ξενιστή σε πιθανές παθογόνες προκλήσεις.



Εικόνα 1.1 Μακροφάγα (Φαγοκυττάρωση & Αντιγονοπαρουσιαστικά APC's)

#### 1.4 Εξειδικευμένο ή επίκτητο ανοσοβιολογικό σύστημα

Είναι πιο χρονοβόρο στην εκδήλωσή του αλλά έχει μεγαλύτερη διάρκεια από το μη ειδικό ανοσοβιολογικό σύστημα. Περιλαμβάνει το συστημικό μέρος που φέρεται από την κυκλοφορία του αίματος και το τοπικό μέρος που εκδηλώνεται στις εξωτερικές σωματικές επιφάνειες. Τα λεμφοκύτταρα (τύπου «B» και τύπου «T» που υποδιαιρούνται σε υποτύπους), εκδηλώνουν ειδικούς υποδοχείς και παράγουν χυμικούς παράγοντες (ανοσοσφαιρίνες, ιντερλευκίνες και ιντερφερόνες). Τα λεμφοκύτταρα περιλαμβάνουν τόσο τα δραστικά κύτταρα που ζουν λίγο όσο και τα μακράς διάρκειας κύτταρα μνήμης που καθιστούν τη δευτεροταγή ή αναμνηστική ανοσοβιολογική αντίδραση δυνατή και άκρως αποτελεσματική καθότι οργανωμένη, στοχευμένη και ταχεία (*Secombes & Wang.,2012*).

Σε γενικές γραμμές, το ακριβές είδος, ο χρονισμός και το μέγεθος του επίκτητου ανοσοβιολογικού συστήματος εξαρτώνται από τους παρακάτω παράγοντες:

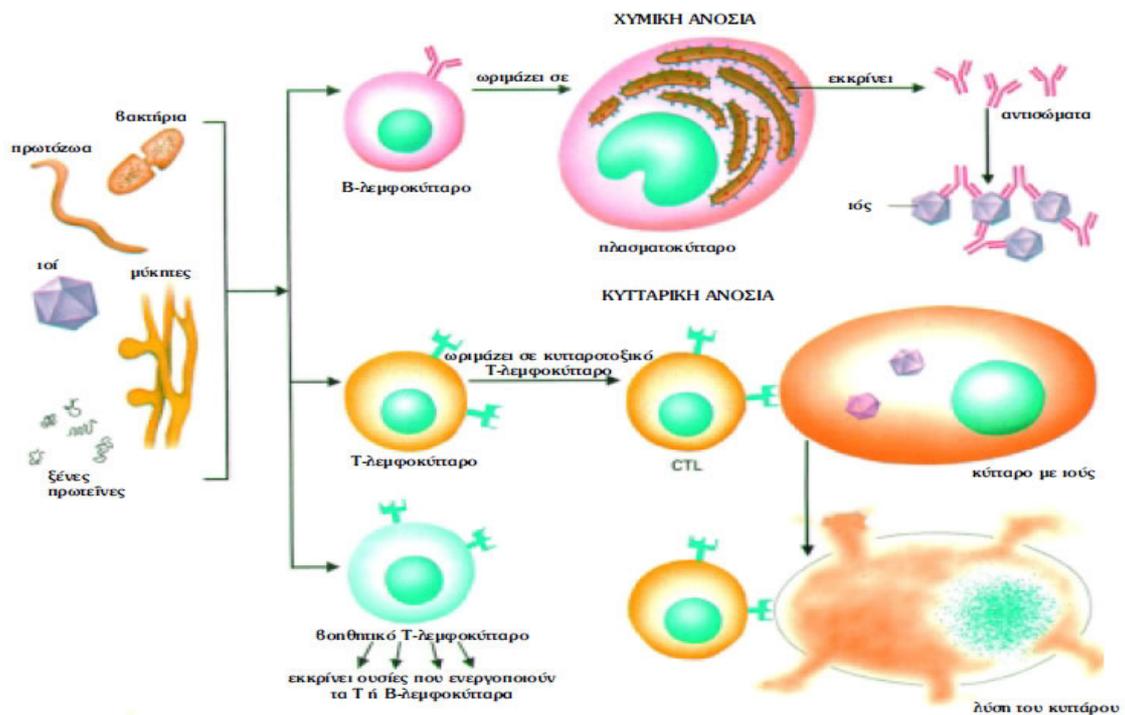
- ο την κατάσταση που βρίσκεται ο οργανισμός γενικά και το ανοσοβιολογικό ειδικότερα,
- ο το είδος και τη δοσολογία του ανοσογόνου συστατικού (ή των συστατικών),
- ο την οδό χορήγησης και τη θέση εισόδου,
- ο τις εξωτερικές συνθήκες κυρίως τη θερμοκρασία, και
- ο την πιθανή παρουσία ανοσοτροποποιητικών ουσιών (ενισχυτικών ή καταπιεστικών).

Συνοπτικά η λειτουργία του ειδικού ανοσοβιολογικού συστήματος θα μπορούσε να περιγραφεί ως ακολούθως: το μακροφάγο ή δενδριτικό κύτταρο επιδεικνύει ένα μέρος του μικροοργανισμού μόλις έρθει σε επαφή μαζί του μέσω μίας πρωτεΐνης στον υποδοχέα MCH II. Το αντιγονοπαρουσιαστικό πλέον κύτταρο συνδέεται με ένα T-βοηθητικό λεμφοκύτταρο (T-helper cell) μέσω ενός υποδοχέα του (T cell receptor). Η ένωση προκαλεί την παραγωγή μίας ουσίας, από το μακροφάγο, της Ιντερλευκίνης-1 (IL-1). Η ουσία αυτή με τη σειρά της προκαλεί την έκκριση μίας άλλης ουσίας της Ιντερλευκίνης-2 (IL-2) αυτή τη φορά από το T – helper cell. Η IL-2 εγχέεται μέσα στο κυκλοφορικό σύστημα και ενεργοποιεί δύο άλλες ομάδες λεμφοκυττάρων, τα T κυτταροτοξικά και τα B λεμφοκύτταρα. Παράλληλα ελευθερώνεται και μία ακόμα

ουσία η Ιντερφερόνη γ η οποία ενημερώνει το αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο να ενεργοποιήσει και άλλα T-helper cells. Στο σημείο αυτό ξεκινά η διαδικασία της κυτταρικής και της χυμικής ανοσίας σχεδόν παράλληλα.

Στην κυτταρική ανοσία, εισέρχεται ο μικροοργανισμός εντός του κυττάρου όπου και το μολύνει. Ακολούθως μέσω του υποδοχέα MCH I επιδεικνύει ένα μέρος του, το αντιγόνο, στην πλασματική μεμβράνη. Ο συγκεκριμένος υποδοχέας ενεργοποιεί το T-κυτταροτοξικό λεμφοκύτταρο το οποίο μέσω του υποδοχέα TCR ενώνεται με το κύτταρο και εκκρίνει ουσίες μέχρι την καταστροφή του μολυσμένου κυττάρου.

Στη χυμική ανοσία γίνεται διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων. Τα B cells φέρουν στην πλασματική τους μεμβράνη διάφορα είδη πρωτεϊνών σχήματος Y που καλούνται αντισώματα ή ανοσοσφαιρίνες. Μόλις εντοπίσουν ένα αντιγόνο τότε προσδένονται σε αυτό, το επεξεργάζονται και στη συνέχεια το παρουσιάζουν στην πλασματική τους μεμβράνη μέσω των υποδοχέων MCH II και προσελκύουν τα T – helper cells. Μόλις το T – helper cell ενωθεί με το B cell και αναγνωρίσει το αντιγόνο παράγει ιντερλευκίνες που πολλαπλασιάζουν τα B λεμφοκύτταρα σε δύο διαφορετικές ομάδες. Η πρώτη ομάδα είναι τα B πλασματοκύτταρα, εργοστάσια αντισωμάτων, και η δεύτερη ομάδα είναι τα κύτταρα μνήμης.



Εικόνα 1.2 Ανοσοβιολογική αντίδραση

## 1.5 Γενικές αρχές

Οι γενικές αρχές στις οποίες βασίζεται η λειτουργία του ανοσοβιολογικού συστήματος των ψαριών είναι:

- Ο συνδυασμός των γενικών και ειδικών αποκρίσεων.
- Ο καταμερισμός καθηκόντων μεταξύ των διαφορετικών τύπων ανοσοκυττάρων.
- Η συνεχής επικοινωνία και η ανταλλαγή σημάτων μεταξύ των διαφόρων μερών του συστήματος.
- Η ισορροπία μεταξύ των αντιδράσεων, π.χ. μεταξύ των υπέρ και κατά των φλεγμονών σημάτων.
- Η προσαρμοστικότητα και η συνεχής καινοτομία για την αντιμετώπιση της αντιγονικής ποικιλομορφίας (*Trowsdale & Parham, 2004*).

Σημαντικό είναι το ανοσοβιολογικό σύστημα να βρίσκεται συνεχώς στη μέγιστη φυσιολογική κατάσταση ετοιμότητας, ακόμη και όταν δεν υπάρχει κάποια ενεργός απειλή. Για τον λόγο αυτόν βρίσκεται σε στρατηγικά σημεία του οργανισμού (κοντά στις πιθανές «εισόδους» παθογόνων), ώστε να μπορεί να αντιλαμβάνεται και να επικοινωνεί μεταξύ των μερών του τις πληροφορίες που συλλέγει και να αποκρίνεται άμεσα σε κάθε περίπτωση κινδύνου καθώς και να κλιμακώνει και να διατηρεί την αντίδρασή του στο απαραίτητο επίπεδο για όσο χρόνο χρειαστεί. Το ευάλωτο ανοσοβιολογικό σύστημα καθιστά τον οργανισμό αδύνατο σε πιθανές ασθένειες.

## 2. ΕΜΒΟΛΙΑ

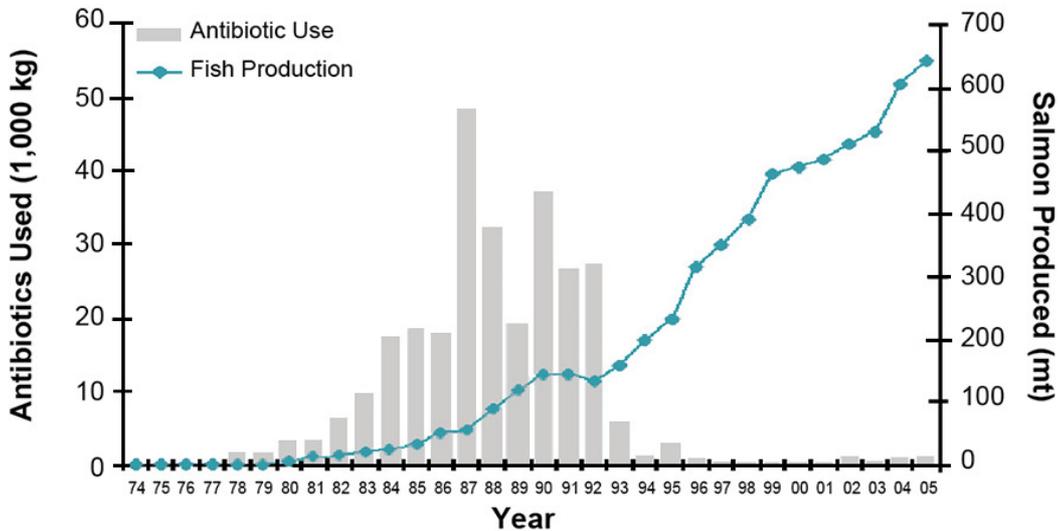
### 2.1 Ιστορική αναδρομή

Τα πρώτα εμβόλια που δημιουργήθηκαν για τα εκτρεφόμενα ψάρια και αφορούσαν σε πρόληψη των βακτηριακών μολυσματικών ασθενειών αναπτύχθηκαν τη δεκαετία του 1970. Συγκεκριμένα το πρώτο εμπορικό εμβόλιο που παρασκευάστηκε για τις υδατοκαλλιέργειες αδειοδοτήθηκε το 1976 και ήταν για την πρόληψη της εντερικής ερυθροστοματίτιδας (*Evelyn, T.P.T. et al.,1997*). Η εφαρμογή τους στην υδατοκαλλιέργεια ξεκίνησε στις αρχές της δεκαετίας του 1980, ενώ την ίδια περίοδο η δημοτικότητα της αντιβιοτικής θεραπείας άρχισε να μειώνεται, καθώς η συχνότητα των περιπτώσεων αντοχής των βακτηριδίων στα αντιβιοτικά και η εμφάνιση παθογόνων ιών για τα ψάρια αυξάνονταν (*Evelyn, T.P.T. et al.,1997*).

### 2.2 Σκοπός του εμβολιασμού

Η πρόληψη της εμφάνισης ασθενειών των ψαριών στην υδατοκαλλιέργεια καθίσταται επιτακτική ώστε το τελικό προϊόν της να είναι ασφαλές προς κατανάλωση. Η πρόληψη επιτυγχάνεται με τη χρήση εμβολίων ώστε να μειωθεί η πιθανότητα εμφάνισης ασθενειών και να αποφευχθεί η ανάγκη χρησιμοποίησης κάποιας φαρμακευτικής ουσίας για τη θεραπεία. Τα εμβόλια είναι εγκεκριμένα σκευάσματα, υπάγονται σε συγκεκριμένες νομοθεσίες, χρησιμοποιούνται ακόμα και σε νεαρά ψάρια τα οποία μπορεί να μην προσφέρονται άμεσα στον καταναλωτή αλλά προστατεύονται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Ο εμβολιασμός ως μέσο προληπτικής προσέγγισης των ασθενειών υπερτερεί της αντίστοιχης θεραπευτικής που προσφέρουν τα αντιβιοτικά. Τα αντιβιοτικά είναι προϊόντα υψηλού κόστους και προσφέρουν μόνο μικρής χρονικής διάρκειας προστασία απαιτώντας πολλαπλές επαναλήψεις, ενώ αντίθετα τα εμβόλια μπορούν να εξασφαλίσουν μεγάλης διάρκειας προστασία με μία ή δυο το πολύ εφαρμογές (*Ellis,1985*), κάτω από εντατικές συνθήκες εκτροφής (*Adams A. et al.,1997*). Συνεπώς, με την εφαρμογή των εμβολιασμών επιτεύχθηκε η μείωση της

χρήσης των αντιβιοτικών (Midtlyng, P.J. et al., 1996a). Συμπερασματικά, η εισαγωγή του εμβολιασμού στις υδατοκαλλιέργειες εντατικής κυρίως εκτροφής οδήγησε σε προϊόντα καλύτερης ποιότητας με την αντίστοιχη μείωση του κόστους παραγωγής.



Εικόνα 2.1 Απεικονίζεται η μείωση της χρήσης των αντιβιοτικών με την ταυτόχρονη αύξηση της παραγωγής σολομοειδών ως συνέπεια της εφαρμογής εμβολιαστικών προγραμμάτων στις υδατοκαλλιέργειες που ξεκίνησαν λίγο μετά τα μέσα της δεκαετίας του '80

### 2.3 Αποτελεσματικότητα των εμβολίων

Η αποτελεσματικότητα των εμβολιασμών που εφαρμόζονται σήμερα στα ψάρια, τόσο ως προς το βαθμό ανοσοβιολογικής αντίδρασης που επιτυγχάνεται όσο και ως προς τη διάρκεια της, εξαρτάται από πολλούς και ποικίλους παράγοντες. Οι κυριότεροι από αυτούς τους παράγοντες είναι η μέθοδος χορήγησης των εμβολίων, η φύση του αντιγόνου που χρησιμοποιείται, η χρήση εκδόχων/ανοσοενισχυτικών, η δόση του εμβολίου (και στην περίπτωση του εμβολιασμού με τη μέθοδο της εμβάπτισης ο χρόνος έκθεσης στο εμβόλιο), το στάδιο ανάπτυξης των ψαριών, η κατάσταση του ανοσοβιολογικού συστήματος των ψαριών, η θρεπτική τους κατάσταση και η θερμοκρασία του νερού (Fender, D.C. et al., 1978, Tatner, M.F. et al., 1983, Tatner M.F., 1987, Lillehaug, A. et al., 1993, Zapata, A.G. et al., 1997).

## 2.4 Μηχανισμός δράσης των εμβολίων

Ο μηχανισμός δράσης των εμβολίων διακρίνεται στις ακόλουθες κατηγορίες ανάλογα με το είδος του αντιγόνου που χρησιμοποιείται για να προκαλέσει την ανοσοβιολογική αντίδραση.

### 2.4.1 Εμβόλια με αδρανοποιημένους μικροοργανισμούς (Killed vaccines)

Στη συγκεκριμένη κατηγορία η αδρανοποίηση επιτυγχάνεται μέσω της επεξεργασίας των μικροοργανισμών με φυσικά ή χημικά μέσα ή με ακτινοβολία ώστε να χάσουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού τους μέσα στον ξενιστή χωρίς να απωλέσουν τη λοιμογονικότητά τους (Tlaxca, J.L. et al.,2015). Σε αντίθεση με τα live vaccines είναι περισσότερο σταθερά και οικονομικότερα στην παραγωγή τους (Biering, E. et al.,2005) και κάνουν αδύνατη τη μεταστροφή του παθογόνου στη λοιμογόνο μορφή του, εφόσον η αδρανοποίηση έχει πραγματοποιηθεί σωστά. Δεν παραμένουν στο περιβάλλον ή στα εμβολιασμένα ψάρια, επομένως είναι συνήθως ασφαλή αλλά χρειάζονται περισσότερες αναμνηστικές δόσεις επειδή εισάγουν μικρότερης χρονικής διάρκειας ανοσοβιολογική αντίδραση όταν συγκρίνονται με άλλα εμβόλια (Baxter, D.,2007). Επάγεται κυρίως η χυμική ανοσία και υπάρχει ο κίνδυνος πρόκλησης της νόσου λόγω πιθανής μη επαρκούς αδρανοποίησης του ιού (Pasquale, A.D et al.,2015).

Στην μελέτη των (Bricknell, I.R. et al.,1997) καταγράφηκε ο πρώιμος για την εποχή εμβολιασμός του συγκεκριμένου τύπου, σε ενέσιμη μορφή, έναντι του παθογόνου *A. salmonicida* σε σολομό Ατλαντικού χωρίς όμως ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Παράλληλα, τα εμβόλια υπομονάδων, τα οποία βασίζονται σε αδρανοποιημένα βακτηριακά στελέχη, παρέχουν στους παραγωγούς μία οικονομική λύση έναντι συγκεκριμένων παθογόνων ακόμα και στην περίπτωση που δεν υπάρχει το αντίστοιχο εμπορικό εμβόλιο (Sudheesh, P.S. et al.,2017). Στην έρευνα των (Tobar., I. et al.,2015), την οποία θα αναλύσουμε διεξοδικότερα παρακάτω, καταγράφεται πως η ανοσοβιολογική μνήμη των ενέσιμων εμβολίων μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά εάν η αναμνηστική δόση χορηγηθεί από το στόμα.

#### 2.4.2 Εμβόλια με εξασθενημένους μικροοργανισμούς (Live – Attenuated vaccines)

Πρόκειται για μικροοργανισμούς οι οποίοι έχουν απωλέσει τη λοιμογονικότητά τους, αλλά διατηρούν την ικανότητα ανάπτυξης τους στον οργανισμό στον οποίο ενοφθαλμίζονται. Επάγουν χυμική και κυτταρική ανοσία (*Levine, M.M. et al.,2004*). Ο μηχανισμός του συγκεκριμένου εμβολίου έγκειται στην καλλιέργεια του βακτηρίου ή του ιού, σε θρεπτικό μέσο, υπό μη φυσιολογικές συνθήκες για αυτό και στην επιλογή των μεταλλαγμένων μορφών του που έχουν προσαρμοστεί και αναπτύσσονται καλύτερα σε αυτές τις συνθήκες (*Desmettre, P. et al.,1997*). Εξασφαλίζουν ανοσοβιολογική μνήμη, κατά συνέπεια χορηγείται μία μόνο αναμνηστική δόση. Σε γενικές γραμμές τα live vaccines έχουν αποδειχθεί ασφαλή στις περισσότερες περιπτώσεις, παρ' όλα αυτά υπάρχει ο κίνδυνος μεταστροφής στη λοιμογόνο μορφή τους.

#### 2.4.3 Εμβόλια υπομονάδων (Subunit vaccines)

Όταν η καλλιέργεια του παθογόνου μικροοργανισμού είναι χρονοβόρα και τεχνικά δύσκολη, η χρησιμοποίηση των συγκεκριμένων εμβολίων κρίνεται χρήσιμη αφού λαμβάνουν το ανοσογόνο μέρος του ιού και όχι ολόκληρο τον ιό και το χρησιμοποιούν ως εμβόλιο. Επί της ουσίας, υπάρχει μία πληθώρα εκτρεφόμενων ειδών που κινδυνεύουν από διάφορα παθογόνα γεγονός που κάνει σχεδόν αδύνατη τη μαζική παραγωγή εμπορικών εμβολίων τόσο από οικονομική σκοπιά όσο και από θέμα χρόνου (*Adams, A.,2019*). Τα εμβόλια υπομονάδων κρίνονται ασφαλή αλλά η ανοσογόνος φύση τους είναι πολύ φτωχή συγκρινόμενη με άλλα είδη εμβολίων. Σε αυτή την περίπτωση κρίνεται απαραίτητη η χρήση ανοσοενισχυτικών για τη βελτίωση της ανοσογονικότητάς τους (*Dadar, M. et al.,2016*).

Υπάρχουν πολλοί τρόποι παραγωγής εμβολίων υπομονάδων. Ένας από αυτούς είναι η μέθοδος των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Τα ανοσογονικά στοιχεία μπορούν να απομονωθούν και να καθαριστούν απευθείας από το παθογόνο-στόχο ή ειδικές ανοσογονικές πρωτεΐνες μπορούν να παραχθούν χρησιμοποιώντας ποικίλες

ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες (ιοί ή βακτήρια) ως φορείς. Η *E.coli* είναι ένα σύστημα έκφρασης βακτηρίου (υπάρχουν και άλλα όπως *P.Pistoris*) που έχει χρησιμοποιηθεί αρκετά συχνά για τον πολλαπλασιασμό των πλασμιδίων φέροντας γονίδια που κωδικοποιούν ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Σε αντιπαράθεση με τα κόστη παραγωγής, η παραγωγή των συγκεκριμένων εμβολίων ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης κρίνεται σχετικά ασύμφορη ειδικά στην περίπτωση καλλιέργειας ειδών μικρής οικονομικής αξίας. Αυτό οφείλεται στις πρόσθετες μεθόδους επεξεργασίας των πρωτεϊνών για να εξασφαλιστεί η αποδοτικότητα του εμβολίου (*Barnes,2019*). Παρ' όλους όμως τους περιορισμούς γίνεται ξεκάθαρο πως η συγκεκριμένη στρατηγική έχει μεγάλη πιθανότητα επιτυχίας ιδιαίτερα για παθογόνα τα οποία είναι δύσκολο να καλλιεργηθούν όπως ο ιός *P. myocarditis* που προκαλεί το σύνδρομο μυοκαρδιοπάθειας στον σολομό Ατλαντικού.

Τα Virus-like particles (VLPs) νανοσωματίδια είναι στοιχεία ενός προχωρημένου σχεδιαστικά εμβολίου υπομονάδων, όπου το έλυτρο της ιικής πρωτεΐνης είναι σε πολύ μικρά κομμάτια τα οποία μιμούνται τη δομή ενός ιού (*Rosenthal, J.A. et al.,2014*). Τα VLPs δεν είναι τοξικά για τα ψάρια, ούτε για τον άνθρωπο. Επιπλέον, η θετικά φορτισμένη επιφάνειά τους και η πολύπλοκη σταθερότητά τους σε διαφορετικές συνθήκες pH επιτρέπει την προστασία του ενθυλακωμένου πλασμιδίου DNA (στην περίπτωση ενός DNA εμβολίου). Μπορούν να παραχθούν σε βακτήρια, ζυμομύκητες, έντομα, θηλαστικά και σε διαγονιδιακά φυτά.

#### 2.4.4 Εμβόλια νουκλεϊκών οξέων (DNA vaccines)

Από τη βιβλιογραφία φαίνεται πως τα εμβόλια νουκλεϊκών οξέων συνδυάζουν τα θετικά των ζωντανών αδρανοποιημένων και των εμβολίων υπομονάδων (*Ulmer, J.B. et al.,2016*). Τα εμβόλια DNA ή RNA όπου το γονίδιο, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη με την αντιγονική δράση, εισάγεται κατευθείαν στο γονιδίωμα του οργανισμού, θεωρούνται σχετικά απλούστερα στην παραγωγή από τα άλλα εμβόλια και ασφαλή, επειδή το αντιγόνο δεν μπορεί να επιστρέψει στην αρχική λοιμογόνο του κατάσταση (*Ulmer, J.B. et al.,2012*).

Τα DNA εμβόλια αποτελούνται από πλασμίδια που μεταφέρουν ένα συγκεκριμένο αντιγόνο το οποίο κωδικοποιεί μία κατάλληλα επιλεγμένη αντιγονική πρωτεΐνη, η οποία όταν εκφράζεται στον ξενιστή αναμένεται να προκαλέσει ισχυρή ανοσοβιολογική αντίδραση. Η παραγωγή και ο πολλαπλασιασμός των πλασμιδίων πραγματοποιείται εντός των βακτηριακών κυττάρων και το επιλεγμένο γονίδιο συνοδεύεται από στοιχεία που διευκολύνουν την έκφραση του εντός των προκαρυωτικών κυττάρων (όπως η *E.coli*) (Kurath, G.,2008). Τα DNA εμβόλια προκαλούν ισχυρή χυμική και κυτταρική ανοσία. Κρίνονται ιδιαίτερα αποτελεσματικά κυρίως έναντι των ιών επειδή χρησιμοποιούν τους ίδιους κυτταρικούς μηχανισμούς που χρησιμοποιεί και ένας ιός όταν εισάγεται στα κύτταρα του ξενιστή.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο τρόπος χορήγησης των εμβολίων γίνεται κυρίως με ενδομυϊκή ένεση αφού κρίνεται ασφαλέστερος τρόπος ώστε να προστατευτεί το γενετικό υλικό και να εισαχθεί στα κύτταρα του ξενιστή. Παρακάτω, στο κεφάλαιο με τις μελέτες της δια του στόματος χορήγησης του εμβολίου, θα συναντήσουμε περιπτώσεις όπου τα εμβόλια DNA δίνουν αποτελέσματα καλύτερα της ενέσιμης μεθόδου. Σύμφωνα με τους (Høivold, L.B. et al.,2014) η κυτταρική και χυμική ανοσία μετά τη χορήγηση DNA εμβολίου είναι παρόμοια με αυτή των θηλαστικών. Μπορούν επίσης να είναι και πολυδύναμα. Κρίνονται ασφαλέστερα από τα εμβόλια με εξασθενημένους μικροοργανισμούς γιατί χρησιμοποιούν τμήματα της αντιγονικής πρωτεΐνης και όχι ολόκληρο τον οργανισμό (Weiner, D.B. et al.,2008).

## 2.5 Κατακλείδα

Ολοκληρώνοντας, θα μπορούσαμε να πούμε πως ένα ιδανικό εμβόλιο θα πρέπει να είναι ασφαλές για το ζώο και το περιβάλλον, οικονομικό για μία μεγάλη μονάδα παραγωγής, εύκολο στη χορήγησή του, ικανό να επάγει ισχυρή ανοσοβιολογική αντίδραση και μνήμη. Παράλληλα να έχει όσο το δυνατόν λιγότερες παρενέργειες (Jie Ma, et al.,2019). Η είσοδος νέων τεχνολογιών στο φάσμα της βιολογίας και της ιατρικής προσφέρει νέα υποσχόμενα εμβόλια κάτι που παρακολουθούμε στις μέρες της πανδημίας. Οι μονάδες υδατοκαλλιεργειών

βρίσκονται και αυτές μπροστά σε μία νέα πρόκληση, να εισάγουν τη νέα τεχνολογία και να διασφαλίσουν τα υψηλά πρότυπα διαβίωσης και καλής υγείας των εκτρεφόμενων ειδών με τις λιγότερο δυνατές απώλειες. Άλλωστε η υδατοκαλλιέργεια είναι ένας συνεχώς αναπτυσσόμενος κλάδος που εξασφαλίζει υψηλής ποιότητας εδώδιμα προϊόντα στην ανθρώπινη κοινωνία.

### 3. ΤΡΟΠΟΙ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΕΜΒΟΛΙΩΝ

Οι κυριότεροι μέθοδοι χορήγησης εμβολίων στα ψάρια πραγματοποιούνται μέσω ένεσης, εμβάπτισης ή χορήγησης από το στόμα. Αυτές οι μέθοδοι διαφέρουν μεταξύ τους τόσο ως προς τον χρόνο και το ανθρώπινο δυναμικό που χρειάζεται για την εφαρμογή τους, όσο και ως προς την καταπόνηση (stress) από τους χειρισμούς που υφίστανται τα ψάρια κατά τον εμβολιασμό.

#### 3.1 Μέθοδος της εμβάπτισης

Είναι μια κλασική πρακτική στις υδατοκαλλιέργειες και χρησιμοποιείται συχνά σε εμπορικά εμβόλια για παθογόνους μικροοργανισμούς, όπως τα *Vibrio spp.* και το *Photobacterium damsela spp.* (Hörne,1997). Η μέθοδος ενδείκνυται για μαζικούς εμβολιασμούς κυρίως μικρών ψαριών. Τα ψάρια βυθίζονται για 20-30 δευτερόλεπτα σε δεξαμενή που περιέχει το διαλυμένο εμβόλιο. Μέσω της συγκεκριμένης μεθόδου επιτυγχάνεται ο μικρός χρόνος διάρκειας του εμβολιασμού και η ελαχιστοποίηση της καταπόνησης που υφίστανται τα ψάρια (Press, et. al.,1995). Το εμβόλιο εφαρμόζεται εξωτερικά στα ψάρια χρησιμοποιώντας διαφορετικές τεχνικές, μεταξύ των οποίων ο ψεκασμός, η άμεση εμβάπτιση και η έκθεση στη σάρκα (Anderson et al.,1983). Το αντιγόνο εισέρχεται στο σώμα των ψαριών μέσω του δέρματος ή των βραγχίων. Η τελική ανοσία που θα αποκτήσουν τα ψάρια είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη συγκέντρωση του εμβολίου στη δεξαμενή και τη διάρκεια της παραμονής των ψαριών σε αυτή. Το κύριο πλεονέκτημα του εμβολιασμού με εμβάπτιση είναι ο τρόπος εισόδου του εμβολίου στον οργανισμό των ψαριών που γίνεται από τις ίδιες οδούς που χρησιμοποιούν πολλοί παθογόνοι παράγοντες, ενεργοποιώντας έτσι και το τοπικό ανοσοβιολογικό σύστημα της βλέννας, όπου για παράδειγμα, είναι πολύ πιθανή η συνάντηση με έναν παθογόνο παράγοντα (Dos Santos et al.2001, Gudding et al.1999, Lobb1987, Lumsden et al.1993). Ωστόσο, η μέθοδος έχει και μειονεκτήματα. Χρησιμοποιεί μεγαλύτερη ποσότητα εμβολίου και η διάθεση της εναπομείνουσας ποσότητας του δημιουργεί πρόβλημα (Austin,1984). Η συστηματική ανοσοβιολογική

απόκριση που επιτυγχάνεται με τη μέθοδο της εμβάπτισης είναι γενικά λιγότερο έντονη και μικρότερης διάρκειας σε σχέση με αυτήν που επιτυγχάνεται μέσω του εμβολιασμού με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση (*Nakanishi and Ototake,1997*).

Η διαδικασία του εμβολιασμού με άμεση εμβάπτιση περιλαμβάνει τον διαχωρισμό και περιορισμό μεγάλων ομάδων ψαριών με τη βοήθεια σάκων μέσα στους οποίους προστίθεται η κατάλληλη δόση διαλυμένου αναισθητικού, ενώ ταυτόχρονα εφαρμόζεται συνεχής παροχή οξυγόνου ή αέρα για να αποφευχθεί τυχούσα ανοξία, στη συνέχεια υπολογίζεται η ποσότητα του κατάλληλου εμβολίου με βάση την εκτιμώμενη βιομάζα των ψαριών. Στη συνέχεια, τα αναισθητοποιημένα ψάρια μεταφέρονται πίσω στις δεξαμενές τους όπου υπάρχει η κατάλληλη οξυγόνωση (*Varvarigos,2003*).



Εικόνα 3.1 Immersion vaccine

### 3.2 Μέθοδος με ενδοπεριτοναϊκή/ενδομυϊκή έγχυση

Είναι μία συνήθης μέθοδος εμβολιασμού των ψαριών που εξασφαλίζει την καλύτερη και τη μεγαλύτερη σε διάρκεια προστασία. Σύμφωνα με τελευταίες μελέτες που θα εξετάσουμε παρακάτω θα δούμε πως και η μέθοδος χορήγησης του εμβολίου από το στόμα μπορεί να επιτύχει παρόμοια αποτελέσματα. Ο εμβολιασμός με αυτήν τη μέθοδο έχει το πλεονέκτημα ότι εξασφαλίζει τη χορήγηση της σωστής δόσης εμβολιακού αντιγόνου σε κάθε ψάρι (*Ellis 1988, Smith 1988*). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί λιγότερη ποσότητα εμβολίου σε σχέση με τις άλλες μεθόδους, ωστόσο είναι κατάλληλη για εφαρμογή μόνο σε ψάρια μεγέθους άνω των 10 γραμμαρίων (*Press*

and Lillehaug,1995). Επίσης, απαιτεί εντατική εργασία, είναι ακριβή και σε συνδυασμό με τα πηκτά ελαιώδη έκδοχα μπορεί να προκαλέσει συμφύσεις αν δεν χορηγηθεί σωστά (Ellis,1997). Κατά τη διαδικασία του εμβολιασμού με ενδοπεριτοναϊκή ένεση, τα ψάρια διαχωρίζονται, γίνονται ομάδες και απομονώνονται από τα υπόλοιπα ψάρια του κλωβού. Χρειάζεται μεγάλη φροντίδα κυρίως κατά τη διάρκεια της χορήγησης των αναισθητικών, καθώς όσο μεγαλύτερο είναι το ψάρι τόσο αυξάνεται ο κίνδυνος τραυματισμών λόγω της καταπόνησης. Τα αναισθητοποιημένα ψάρια μεταφέρονται στη συνέχεια σε ειδικό τραπέζι εμβολιασμού, όπου χορηγείται μια συγκεκριμένη δόση εμβολίου η οποία εγχέεται στην κοιλιακή περιοχή κάθε ψαριού. Στη συνέχεια, τα εμβολιασμένα πλέον ψάρια ελευθερώνονται πίσω στις δεξαμενές τους όπου γίνεται ανάνηψη από την αναισθησία μέσα σε λίγα λεπτά. Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι υπάρχει και η μέθοδος εμβολιασμού με ενδομυϊκή ένεση, αλλά χρησιμοποιείται σπανιότερα.



Εικόνα 3.2 Vaccine via injection

### 3.3 Μέθοδος χορήγησης από το στόμα

Η ενέσιμη χορήγηση του εμβολίου δεν καθίσταται πρακτική σε ικανοποιητικό βαθμό, ειδικότερα για ψάρια μικρού μεγέθους ή στα πρώιμα στάδια της ζωής τους τα οποία και κρίνονται ως η σημαντικότερη φάση για την ανοσοβιολογική προστασία. Η

oral μέθοδος χορήγησης του εμβολίου με αντιγόνο που ενσωματώνεται στην τροφή κρίνεται στις μέρες μας ως η πιο πολλά υποσχόμενη μέθοδος για την ανοσοποίηση των εκτρεφόμενων ειδών μεγάλης κλίμακας. Ο γαστρεντερικός σωλήνας αντιπροσωπεύει την ιδανική οδό για την έκφραση του αντιγόνου και της ενεργοποίησης της ανοσοποίησης στα ψάρια δεδομένης της παρουσίας του λεμφικού ιστού του εντέρου που σχετίζεται με τον βλεννογόνο (Tonheim et al.,2008; Aravena et al.,2013). Στην πραγματικότητα ο βλεννογόνος του εντέρου περιγράφεται ως η ιδανική είσοδος για πολλά παθογόνα των ψαριών (Bhavsar and Amiji,2007; Aravena et al.,2013; Mutoloki et al.,2015). Η δια του στόματος χορήγηση σχετίζεται με ένα εύρος φυσιολογικών μηχανισμών, που οδηγούν σε υποβάθμιση της προστασίας του εμβολίου στον γαστρεντερικό σωλήνα μέσω της ταχείας υδρόλυσης, όπως είναι το επίπεδο οξύτητας και οι πεπτικές νουκλεάσες. Φαίνεται πως την επιτυχή αντιμετώπιση του συγκεκριμένου φαινομένου, όπως θα συναντήσουμε σε ακόλουθο κεφάλαιο, μπορεί να την προσφέρει η τεχνική της ενθυλάκωσης. Η συγκεκριμένη τεχνική βοηθά στην παγίδευση και προστασία των αντιγόνων στην πεπτική οδό και πολλές φορές τα υλικά της μπορούν να δράσουν και ως ανοσοδιεργητικά ενισχύοντας ακόμα περισσότερο την ανοσοβιολογική αντίδραση. Στα αρνητικά της μεθόδου θα μπορούσε κάποιος να αναφέρει τη μη ακριβή δόση του εμβολίου σε αντίθεση με την ενέσιμη μέθοδο που είναι εξαρχής μετρημένη, την ανάγκη για ανοσοενισχυτικά και την πιθανή υποβάθμιση του εμβολίου στον γαστρεντερικό σωλήνα.



Εικόνα 3.3 Oral vaccination

## 4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗΣ / ΑΝΟΣΟΕΝΙΣΧΥΤΙΚΑ / ΦΟΡΕΙΣ ΕΜΒΟΛΙΩΝ

### 4.1 Ανοσοενισχυτικά / Adjuvants

Όπως έχουμε αναφέρει ο σκοπός του εμβολιασμού είναι να προφυλάξει από λοιμώδη νοσήματα επάγοντας ανοσοβιολογική απόκριση χωρίς όμως την πρόκληση της νόσου. Τα παλαιότερα εμβόλια περιείχαν εξασθενημένους ή αδρανοποιημένους μικροοργανισμούς, ενώ τα νεότερα παρασκευάζονται από τα κεκαθαρμένα συστατικά τους, κυρίως από την κάψα ή το περίβλημα, με σκοπό τη μείωση των ανεπιθύμητων ενεργειών. Όμως τα εμβόλια από τα συστατικά των παθογόνων χρειάζονται την προσθήκη ανοσοενισχυτικού (adjuvant) για να είναι αποτελεσματικά.

Τα ανοσοενισχυτικά (adjuvants) είναι μία ομάδα δομικών ετερογενών ουσιών που αυξάνουν την ανοσοβιολογική αντίδραση έναντι των αντιγόνων που συγχωρηγούνται. Με τη χρήση των ανοσοενισχυτικών μπορεί να μειώνεται η ποσότητα του αντιγόνου ή οι δόσεις που απαιτούνται για τον εμβολιασμό. Τα ανοσοενισχυτικά στοχεύουν στην ενεργοποίηση των ειδικών Τ και Β λεμφοκυττάρων. Προσφέρουν ταχύτερη προστατευτική ανοσοβιολογική αντίδραση, χρησιμεύουν ως οχήματα για την καλύτερη παρουσίαση των αντιγόνων ειδικά σε βλεννογόνους και δίνουν τη δυνατότητα παραγωγής μεγάλου αριθμού δόσεων σε μικρό χρονικό διάστημα.

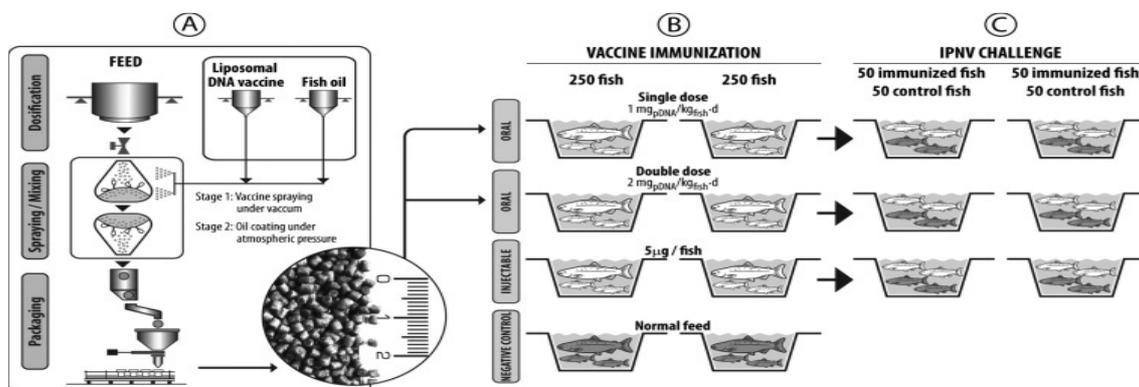
Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη (signal 1) καθορίζει την τύχη του αντιγόνου όσο αφορά στο εύρος του χρονικού διαστήματος απελευθέρωσής του στον οργανισμό, στους ιστούς στους οποίους θα κατευθυνθεί και στη συγκέντρωσή του, βελτιώνοντας τελικά την ανοσοβιολογική του διαθεσιμότητα. Η δεύτερη κατηγορία (signal 2) σχετίζεται με την παρουσίαση του αντιγόνου στα μακροφάγα ή δενδριτικά κύτταρα. Στην πρώτη κατηγορία εντοπίζονται τα γαλακτώματα (oil emulsions), τα νάνο ή μικρο-σωματίδια (με τη λογική του ανοσοενισχυτικού και όχι του φορέα του αντιγόνου), τα PLGA και τα ανοσοβιολογικά συμπλέγματα ISCOMs. Στη δεύτερη κατηγορία συναντούμε τα άλατα μεταλλικών στοιχείων (αλουμινίου, ασβεστίου, σιδήρου), τις β-γλυκάνες, τις σαπωνίνες, τα λιποπεπτίδια, τα flaggelins και τις κυτταροκίνες.

## 4.2 Φορείς εμβολίων / Vaccine carriers

Τα νάνο υλικά (<1000 nm) όπως είναι τα όμοια με ιό σωματίδια (virus-like particles - VLPs), τα λιποσώματα (liposomes) και τα ανοσοδιεγερτικά συμπλέγματα (immunostimulating complexes – ISCOMs), τα πολυμερή και τα μη αποδομήσιμα νανοσφαιρίδια (polymeric nanospheres) έχει αναφερθεί ότι έχουν τη δυνατότητα να δρουν ως φορείς του αντιγόνου του εμβολίου. Τα σταθερά πλέον αντιγόνα των εμβολίων μπορούν να δουλέψουν και ως ανοσοενισχυτικά (Gregory, A.E. et al., 2013). Μπορούν να οδηγήσουν την ανοσοβιολογική απόκριση σε διάφορες κατευθύνσεις εντός του οργανισμού. Τέτοια συστήματα μεταφοράς είναι κατάλληλα για τη μεταφορά μέσω του βλεννογόνου. Επομένως, τα νάνο-σφαιρίδια λειτουργούν και ως ασφαλείς μεταφορείς του αντιγόνου αλλά και επιτρέπουν τη συνεχή και σταδιακή απελευθέρωση των αντιγόνων μειώνοντας σε αρκετές περιπτώσεις την ανάγκη για αναμνηστικές δόσεις (booster vaccinations) (Munang'andu, H.M et al., 2015; Ji, J. et al., 2015). Σχετικά με τα πολυμερικά συστήματα, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον εγκλεισμό αντιγόνων και την ελεγχόμενη μεταφορά πεπτιδίων, συνθετικών πρωτεϊνών και νουκλειικών οξέων, νάνο-σφαίρες πολύ-γαλακτικού-γλυκολικού οξέος (D,L-lactide-co-glycolic acid (PLGA)) και έχουν δοκιμαστεί για τη χορήγηση των oral εμβολίων. Τα PLGA επάγουν ισχυρή και παρατεταμένη ανοσοβιολογική απόκριση. Περισσότερο πρόσφατα τα VLPs έχουν χρησιμοποιηθεί στον εμβολιασμό εκτρεφόμενων ειδών. Θεωρείται μία νέα πλατφόρμα εμβολιασμού γιατί δεν είναι λοιμώδης και επάγει εξουδετερωτικά αντισώματα. Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες κάψας παράγονται σε καλλιέργειες *E. coli* και στη συνέχεια δίνεται η δυνατότητα ενθυλάκωσης τους σε VLPs. Ο ζυμομύκητας *P. pastoris* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτικό σύστημα έκφρασης έναντι του *E. coli* και φαίνεται από τις μελέτες πως είναι ένα καλό όχημα μεταφοράς των αντιγόνων για τον oral εμβολιασμό. Παράλληλα, μπορεί χρησιμοποιηθεί σε μη ενθυλακωμένη μορφή για τα μεγαλύτερα ψάρια ή στη βίο-ενθυλακωμένη μορφή στο στάδιο της λάρβας, αλλά μπορεί να δράσει και ως ανοσοενισχυτικό.

#### 4.3 Τεχνικές ενθυλάκωσης / Encapsulation techniques

Η ενθυλάκωση αναφέρεται στην ενσωμάτωση υλικών, συμπεριλαμβανομένων συστατικών τροφών, κύτταρα ή άλλα, μέσα σε μικρές κάψουλες και επιτυγχάνεται με πολλές διαφορετικές τεχνικές. Είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως στη δια του στόματος χορήγησης του εμβολίου όπως θα δούμε αναλυτικότερα στο Κεφάλαιο 6. Υπάρχουν 3 βασικές μέθοδοι ενθυλάκωσης που θα αναφερθούν παρακάτω και πολλές περισσότερες εξειδικευμένες τεχνικές που εκπορεύονται από αυτές. Η πρώτη μέθοδος βασίζεται στην επιφανειακή λίπανση της ήδη παρασκευασμένης τροφής με εμβολιακή πούδρα χρησιμοποιώντας συγκολλητικούς παράγοντες. Η δεύτερη μέθοδος βασίζεται στον ψεκάσμο της ήδη παρασκευασμένης τροφής με το εμβόλιο εφόσον αυτό είναι σε υγρή μορφή. Η δημιουργία της τρίτης μεθόδου είναι απόρροια της αστοχίας των δύο προαναφερόμενων. Συγκεκριμένα, οι δύο πρώτοι μέθοδοι έχουν το μειονέκτημα της ανομοιόμορφης κατανομής του εμβολίου στην τροφή με αποτέλεσμα την υποβάθμιση του στην πεπτική οδό των εκτρεφόμενων ειδών. Η τρίτη μέθοδος η οποία εξασφαλίζει την ομοιόμορφη κατανομή του εμβολίου στην τροφή βασίζεται στην ανάμειξη του αντιγόνου και της τροφής κατά την παραγωγική διαδικασία. Η διαδικασία που περιγράφουμε μπορεί να επιτευχθεί μέσω εξοπλισμού κενού επικάλυψης (vacuum coater), όπου, συνοπτικά, εξέρχεται ο αέρας από την τροφή, ψεκάζεται με το εμβόλιο, επανέρχεται ο αέρας σε υψηλή πίεση αναγκάζοντας το αντιγόνο να εισέλθει στους πόρους της τροφής.



Εικόνα 4.1 Περιγράφεται σχηματικά ο τρόπος λειτουργίας του εξοπλισμού κενού επικάλυψης όπως εφαρμόζεται στην εργασία των (Reyes M. et al., 2017). Η λογική της διαδικασίας είναι ίδια και σε άλλες πειραματικές μονάδες με μικρές διαφοροποιήσεις

## 5. ΠΑΘΟΓΟΝΑ / ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Στο παρόν κεφάλαιο καταγράφονται οι ασθένειες και οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που τις προκαλούν και τους συναντούμε στο σύνολο των μελετών που κεφαλαίου 6 που ακολουθεί.

### 5.1 Ιογενής εγκεφαλοπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια ή Ιογενής νευρική νέκρωση / *Viral encephalopathy and retinopathy (VER) or Nervous necrosis virus (NNV)*

Πρόκειται για μία θανάσιμη νευροπαθολογική νόσο των ψαριών και αποτελεί σοβαρότατη ιογενή απειλή για τα θαλάσσια εκτρεφόμενα είδη. Ο κύριος παράγοντας της ασθένειας είναι ένας RNA ιός που ανήκει στο γένος *Betanodavirus* της οικογένειας *Nodaviridae*. Μπορεί να προκαλέσει μαζικούς θανάτους που φθάνουν μέχρι και το 100% σε καλλιέργειες κυρίως του είδους *Dicentrarchus labrax*. Προκαλεί κυτταρικές αλλοιώσεις, νέκρωση του εγκεφάλου και του αμφιβληστροειδούς χιτώνα. Η ανώμαλη κολυμβητική συμπεριφορά, η μεταβολή της πλευστότητας, η μείωση της όρεξης και οι χρωματικές ανωμαλίες του δέρματος (τάση προς την ωχρότητα του δέρματος) είναι κάποια από τα συμπτώματα της ασθένειας. Η νόσος εμφανίζεται κυρίως στο στάδιο των νυμφών και των ιχθυδίων των ειδών. Παράγοντες που καθορίζουν την εξάπλωση της ασθένειας είναι το βιολογικό στάδιο των ψαριών, η φάση της ασθένειας και η θερμοκρασία. Ο ιός μεταδίδεται κατά κύριο λόγο οριζόντια αλλά έχουν καταγραφεί και περιπτώσεις κάθετης μετάδοσης. Ο πιο κοινός γενότυπος που έχει βρεθεί στη Μεσόγειο είναι ο *red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV)* (Valero, Y. et al., 2021).

### 5.2 Λοιμώδης αναιμία του σολομού / *Infectious salmon anemia (ISA)*

Είναι μία συστηματική ασθένεια που επιδρά στα σολομοειδή και ειδικότερα στο είδος *Salmo salar*. Ο κύριος παράγοντας της ασθένειας είναι ο ιός της λοιμώδους

αναιμίας του σολομού (*ISAV*). Παρόμοια με τους υπόλοιπους ορθομυξιοϊούς (*orthomyxovirus*) όπως η *influenza*, ο *ISAV* είναι ένας ελυτροφόρος ιός (*enveloped*) και παρουσιάζει στη μεμβράνη του μία προεξέχουσα πρωτεΐνη σε σχήμα μανιταριού. Πρόκειται για την πρωτεΐνη *hemagglutinin-esterase* - αιμοσυγκολλητίνη (*HE*) στην οποία οφείλεται η τοξικότητά του ενώ η ικανότητα συγχώνευσής του οφείλεται στην πρωτεΐνη *F*. Ο ρυθμός της ασθένειας ποικίλλει από 10% έως 95%. Τα κυριότερα κλινικά ευρήματα εντοπίζονται στο χρώμα των βραγχίων (γίνονται ωχρά), στην εξοφθαλμία, σε οίδημα και στην αιμορραγία. Γενικότερα δεν γίνονται άμεσα αντιληπτά τα συμπτώματα και συνήθως το ψάρι πεθαίνει ξαφνικά. Κατόπιν νεκροψίας εντοπίζονται λειτουργικές ανωμαλίες σε διάφορα όργανα εξαιτίας ενδοεπιθηλιακής ζημιάς, όπως διογκωμένο συκώτι η σπλήνας. Μεταδίδεται οριζόντια, κυρίως από άλλα μολυσμένα ψάρια ή με την επαφή με διάφορα είδη εξοπλισμού ή μέσω των ανθρώπων που έχουν χειριστεί ήδη μολυσμένα ψάρια, (*Falk K. et al.,2004*), (*Clouthier S.C. et al.,2002*), (*Rimstad E. et al.,2002*).

### 5.3 Λοιμώδης παγκρεατική νέκρωση / *Infectious pancreatic necrosis (IPN)*

Πρόκειται για μία ασθένεια που εμφανίζεται πολύ συχνά στις υδατοκαλλιέργειες κυρίως των σολομοειδών και μπορεί να προσβάλλει ευκολότερα τα ψάρια τη στιγμή της εκκόλαψης ή στο πρώτο στάδιο της σίτισης. Το κύριο παθογόνο της ασθένειας είναι ο ιός της λοιμώδους παγκρεατικής νέκρωσης. Ανήκει στην οικογένεια *Birnaviridae* του γένους *Aquabirnavirus*. Πρόκειται για μη ελυτροφόρο ιό του οποίου το γονιδίωμα κωδικοποιεί 5 ζωτικές πρωτεΐνες, τρεις από τις οποίες είναι δομικές και μία είναι η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση. Το κυριότερο σύμπτωμα εντοπίζεται στην ανώμαλη ελικοειδή κολύμβηση κυρίως του γόνου των σολομοειδών. Άλλο ένα σύμπτωμα είναι η μείωση της όρεξης.

#### 5.4 Εντερική ερυθροστοματίτιδα / *Enteric redmouth disease*

Η ερυθροστοματίτιδα είναι νόσημα που προκαλείται από το παθογόνο *Yersinia ruckeri*, ένα gram αρνητικό κινητό βακτήριο. Χαρακτηρίζεται από αιμορραγική σηψαιμία ενώ το σύμπτωμα του ερυθρού στόματος δεν εμφανίζεται πάντοτε. Η *Yersinia ruckeri* έχει 8 ορότυπους που ταξινομούνται με βάση διαφορές ως προς το LPS και O-αντιγόνο. Από αυτούς, οι ορότυποι O:1 και O:2 είναι οι πιο σημαντικοί για την παρασκευή βακτηριακών εμβολίων κατά της εντερικής ερυθροστοματίτιδας και προκαλούν την ανάπτυξη ισχυρής προστατευτικής ανοσίας (*Papadopoulos P. et al.,2008*).

#### 5.5 *Salmon rickettsial septicaemia (SRS)*

Πρόκειται για μία μεταδοτική λοιμώδη ασθένεια που επιδρά στην υδατοκαλλιέργεια σολομού με πολύ σημαντικό οικονομικό αντίκτυπο. Είναι υπεύθυνη για το 50% έως και 97% της θνησιμότητας στον τομέα των υδατοκαλλιεργειών. Η ασθένεια προκαλείται από ένα gram αρνητικό μη-κινητό ενδοκυτταρικό κοκκοειδές βακτήριο, το *Piscirickettsia salmonis*. Το παθογόνο απομονώθηκε πρώτη φορά από το είδος *Coho salmon* στη Χιλή και από τότε έχει αναφερθεί στον Καναδά, στην Ιρλανδία, στη Νορβηγία και στη Σκωτία. Προκαλεί κλινικά συμπτώματα, όπως λήθαργο, σκούρο χρωματισμό στο δέρμα, αναπνευστική δυσκολία, ανώμαλη κολύμβηση και αιμορραγικές εξωτερικές αλλοιώσεις στην έδρα και στον οφθαλμό και συχνά συνοδεύεται από εξοφθαλμία και στοματίτιδα. Οι πιο χαρακτηριστικές αλλοιώσεις εμφανίζονται στα εσωτερικά όργανα που φέρουν υπόλευκα ή κιτρινωπά υποκαψικά οζίδια στο ήπαρ, τη σπλήνα και το νεφρό και συνοδεύονται από ασκίτη, περιτονίτιδα, πετέχειες και εκχυμώσεις, δίνοντας χαρακτήρα συστηματικής σηψαιμικής ασθένειας (*Athanasopoulou F. et al.,2017; Caruffo M. et al.,2021*).

## 6. ORAL VACCINATION

### 6.1 Μελέτες

Στο κεφάλαιο του Oral Vaccination παρατίθενται σχετικά σύγχρονες μελέτες πάνω στα εμπορικά είδη ψαριών *Salmo salar*, *Dicentrarchus labrax* και *Sparus aurata*. Το κείμενο που ακολουθεί προσανατολίζεται στην περιγραφή του εφαρμοζόμενου είδους του εμβολίου και στις πειραματικές ομάδες των ψαριών που οι εκάστοτε ερευνητές δημιούργησαν, με απώτερο σκοπό την αξιολόγηση της πολλά υποσχόμενης μεθόδου χορήγησης του εμβολίου από το στόμα και φυσικά στην αποτελεσματικότητά της. Οι μελέτες αναφέρονται με χρονολογική σειρά ξεκινώντας από την παλαιότερη και καταλήγοντας στη νεότερη. Στο τέλος του κεφαλαίου ακολουθεί η σύνοψη των μελετών.

#### ***Recombinant TNFaas oral vaccine adjuvant protects European sea bass against vibriosis: Insights into the role of the CCL25/CCR9 axis***

Η εργασία των (Vilegas et al.,2013) αναφέρεται στη σύγκριση ανάμεσα σε ένα υπάρχον εμπορικό oral εμβόλιο και στο ίδιο εμβόλιο, αυτή τη φορά όμως ενισχυμένο με την ανασυνδυασμένη κυτταροκίνη *tumor necrosis factor a* (παράγοντας νέκρωσης των όγκων - (*rTNFa*)), σε καλλιέργειες *P. pastoris*, ως ανοσοενισχυτικό για την αντιμετώπιση του παθογόνου *Vibrio anguillarum*. Επί της ουσίας η ενθυλακωμένη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη χρησιμοποιείται ως ενισχυτικό του εμβολίου (*rTNFa*). Ο πληθυσμός που εμβολιάζεται είναι νεαρά άτομα του είδους *Dicentrarchus labrax* (30 g μέσο αρχικό βάρος). Επίσης, μελετώνται μηχανισμοί συστημικών και τοπικών αποκρίσεων, η πιθανή διέγερση αντισωμάτων IgM, η έκφραση του γονιδίου, η συγκέντρωση λεμφοκυττάρων στο έντερο και επιπλέον εργαστηριακές in vitro αναλύσεις.

Χρησιμοποιήθηκε εμπορική τροφή που πέρασε το στάδιο της λυοφιλοποίησης έως ότου λάβει το μισό της βάρους, αναμείχθηκε με τις μικροκάψουλες όπου και

προέκυψε μία ξηρή πάστα και ακολούθως θρυμματίστηκε ώστε να παρασχεθεί στα ψάρια.

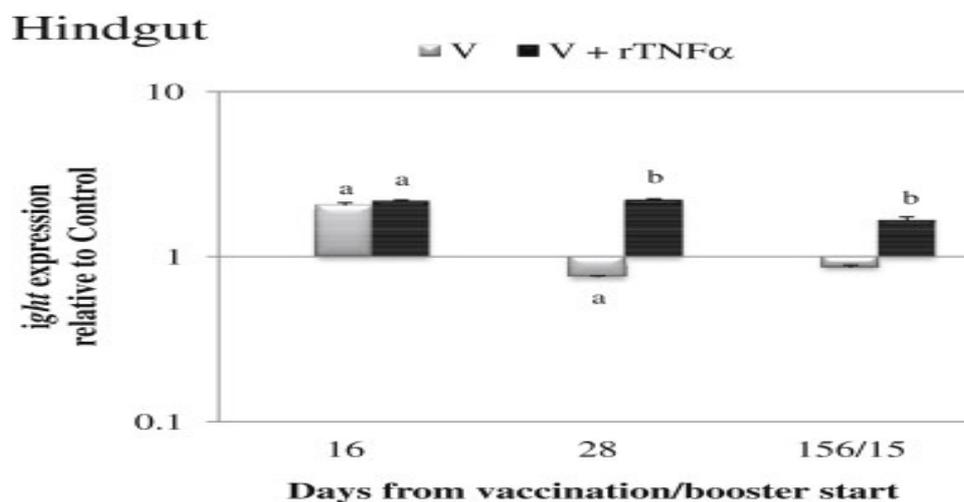
Ο πληθυσμός διακρίθηκε σε 3 κατηγορίες σύμφωνα με τον τύπο εμβολιασμού. Στην πρώτη, χορηγείται το δια του στόματος εμπορικό εμβόλιο (V), στη δεύτερη χορηγείται το δια του στόματος εμπορικό εμβόλιο ενισχυμένο με το ανοσοενισχυτικό *rTNFa* (*V+rTNFa*) και στην τρίτη συναντάται η ομάδα ελέγχου (*Control*). Το πρωτόκολλο εμβολιασμού όριζε 10 μέρες περίοδο προσαρμογής, 5 μέρες εμβολιασμού, 5 μέρες ξεκούρασης και πάλι 5 μέρες εμβολιασμού. Με την πάροδο 4 μηνών επέρχεται η αναμνηστική δόση. Ένας συγκεκριμένος αριθμός ψαριών από κάθε εμβολιαστική ομάδα υπόκειται σε ενδοπεριτοναϊκό εμβολιασμό με το στέλεχος *V. anguillarum* στην 30<sup>η</sup>, 85<sup>η</sup> και 118<sup>η</sup> ημέρα για την εξασφάλιση της μολυσματικότητας. Ως μονάδα μέτρησης της αποτελεσματικότητας χρησιμοποιείται ο δείκτης *RPS* (*Relative Percent Survival*).

Για την αξιολόγηση πιθανής θετικής επίδρασης του εμβολίου (*V+rTNFa*) στο ανοσοβιολογικό σύστημα ελήφθησαν δείγματα ιστών από τον πρόνεφρο (*head-kidney*) και το οπίσθιο μέρος του πεπτικού σωλήνα (*hindgut*). Το πρώτο δείγμα ελήφθησε στην 16<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος και μετά τον πρώτο εμβολιασμό. Στη ομάδα (V) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στην έκφραση της λυσοζύμης και στα δύο όργανα. Στην ομάδα (*V+rTNFa*) παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των ιντερλευκινών *IL-1β* και *IL-10* στο έντερο έναντι των δύο άλλων ομάδων. Μετά την booster δόση στην 156<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος η ομάδα (*V+rTNFa*) παρουσίασε σημαντική αύξηση στα επίπεδα mRNA της ιντερλευκίνης *IL-10* και της λυσοζύμης και στα δύο όργανα.

Στην 8<sup>η</sup> ημέρα μετά το 1<sup>ο</sup> challenge με το ενέσιμο παθογόνο και συγκεκριμένα 173/30 ημέρες μετά τον αρχικό/booster εμβολιασμό, ο δείκτης *RPS* ανήλθε στο 50% και για τις δύο εμβολιασμένες ομάδες, παρουσιάζοντας μία στατιστικά σημαντική αντίσταση στο παθογόνο. Στο 2<sup>ο</sup> challenge, 220/85 ημέρες μετά τον αρχικό/booster εμβολιασμό η ομάδα αναφοράς (*Control*) εμφάνισε 90% θνησιμότητα. Η ομάδα (*V+rTNFa*) εμφάνισε ένα σημαντικό ποσοστό *RPS*=66% ενώ η ομάδα (V) μόλις 23%, δείχνοντας χαμηλή ανοσοβιολογική αντίδραση. Το τελευταίο challenge πραγματοποιήθηκε στις 258/118 ημέρες μετά τον αρχικό/booster εμβολιασμό όπου η

ομάδα (*V+rTNFa*) κατέδειξε υψηλό ποσοστό 84% RPS, ενώ η ομάδα (*V*) εμφάνισε θνησιμότητα αντίστοιχη με αυτή της ομάδας αναφοράς (*Control*). Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων φαίνεται πως το εμπορικό oral εμβόλιο εμφανίζει μείωση της ανοσοβιολογικής αντίδρασης μετά από μία μακρά περίοδο από τη στιγμή του εμβολιασμού αλλά και τη σημαντική βελτίωση του όταν ενισχυθεί με το TNFa.

Συμπερασματικά, η ανοσοβιολογική αντίδραση μέσω της δια του στόματος χορήγησης του εμπορικού εμβολίου χωρίς το ανοσοενισχυτικό έναντι του *V. anguillarum* δεν κρατά για μεγάλο χρονικό διάστημα. Σε αντίθεση, εμπλουτισμένο το εμβόλιο με το ανοσοενισχυτικό *rTNFa* φαίνεται πως παρατείνει το διάστημα της ανοσοβιολογικής αντίδρασης. Σχετικά με τα IgM αντισώματα αποδεικνύεται από την εργασία πως οι δύο ομάδες, εμπορικό δια του στόματος εμβόλιο και το ίδιο ενισχυμένο με *rTNFa*, είναι ανεξάρτητα ως προς την προστασία που επιτυγχάνουν. Παρ' όλα αυτά, το ενισχυμένο εμβόλιο παρουσιάζει αύξηση των αντισωμάτων IgT στον πεπτικό σωλήνα, γεγονός που μεταφράζεται ως ειδική αναγνώριση του αντιγόνου και περαιτέρω ενεργοποίηση των ενδοεπιθηλιακών T λεμφοκυττάρων (*IEL*).



Εικόνα 6.1 Το ενισχυμένο *V+rTNFa* εμβόλιο παρουσιάζει αύξηση των IgT έναντι του απλού εμπορικού εμβολίου.

*Development of a nanoparticle-based oral vaccine for Atlantic salmon against ISAV using an alphavirus replicon as adjuvant*

Στην εργασία των (Aravena et al., 2015) επικεντρώνονται στην ανάπτυξη ενός DNA εμβολίου που βασίζεται στα alphavirus replicons. Συγκεκριμένα, τα χρησιμοποιούν για να αναπτύξουν ένα DNA εμβόλιο ενάντια στο παθογόνο ISAV στον σολομό Ατλαντικού (*Salmo salar*) στο οποίο εκφράζεται η ανασυνδυασμένη φλουορεσκεΐνη (*Green Fluorescent Protein – GFP*) σαν υπο-γονιδίωμα του RNA. Συγκεκριμένα, το υπο-γονιδίωμα αντικαθίσταται από μία ακολουθία της *GFP*.

Εφόσον ανιχνευθεί το γονιδίωμα του παθογόνου ISAV τότε αναπαράγεται και τιτλοδοτείται. Στη συνέχεια ακολουθεί το στάδιο της αδρανοποίησης του ιού. Εφαρμόστηκαν διάφοροι μέθοδοι αδρανοποίησής του, καταλήγοντας στη χρήση της UV ακτινοβολίας, αφού μέσω της μεθόδου *Western blot* επιβεβαιώθηκε η διατήρηση της ανοσογονικότητας της πρωτεΐνης (*Hemagglutinin esterase*) *HE* συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεθόδους αδρανοποίησης. Ακολούθως πραγματοποιείται η ενθυλάκωση όλων των συστατικών στις chitosan μικροκάψουλες. Αυτές αναμείχθηκαν ομοιόμορφα με την τροφή. Η τροφή αποξηράθηκε για μία ώρα στους 30°C και επικαλύφθηκε με 2% φυτικού ελαίου.

Οι ερευνητές της παρούσας εργασίας δοκίμασαν τρεις διαφορετικές μεθόδους αδρανοποίησης του ιού, UV ακτινοβολία, θέρμανση και επώαση σε διάλυμα φορμαλδεΐδης. Όπως προαναφέραμε κατέληξαν στην UV ακτινοβολία, παρ' όλα αυτά παρατήρησαν από τα αποτελέσματα άλλων μελετών πως δεν υπάρχει δεδομένη μέθοδος αδρανοποίησης του ιού. Γεγονός που οδήγησε τους συγγραφείς στο συμπέρασμα πως διαφορετικά στελέχη ISAV μπορούν να έχουν και διαφορετική ευαισθησία στις συνθήκες αδρανοποίησης.

Για την αποτίμηση της επίδρασης της από του στόματος χορήγησης του εμβολίου των NPs στο ανοσοβιολογικό σύστημα των ψαριών, δημιουργήθηκαν 3 ομάδες των 10 ψαριών (40 g). Για την προετοιμασία του μείγματος του εμβολίου, η εμπορική τροφή αναμείχθηκε με δόση DNA ομοιογενώς, αποξηράθηκε για μία ώρα στους 30°C και καλύφθηκε με 2% φυτικού ελαίου. Ακολούθησε η σίτιση των ψαριών με το μείγμα του εμβολίου για 7 ημέρες. Η πρώτη ομάδα εμβολιάστηκε με το *NP-V*

(ενθυλακωμένο αδρανοποιημένο στέλεχος ISAV), η δεύτερη με το NP-Ad (ενθυλακωμένο ανοσοενισχυτικό) και η τρίτη ομάδα με τη μίξη των δύο εμβολίων (NP-V+ NP-Ad). Την 4<sup>η</sup> ημέρα μετά τον εμβολιασμό επιλέγονται δειγματοληπτικά 3 ψάρια από κάθε ομάδα και ξεκινά ο έλεγχος της έκφρασης των κυτταροκινών. Οι ιντερφερόνες IFN $\alpha$  και IFN $\gamma$  διεγείρονται σημαντικά. Η IFN $\alpha$  διεγείρεται στατιστικά σημαντικά στην ομάδα NP-V και NP-Ad, στη σπλήνα, στα νεφρά, στο έντερο και στα βράγχια ενώ δείχνει να διεγείρεται ακόμα περισσότερο στην ομάδα NP-V+NP-Ad. Η IFN $\gamma$  διεγείρεται στατιστικά σημαντικά στα βράγχια από την ομάδα NP-V και ακόμα εντονότερα στην ομάδα NP-Ad. Η ομάδα NP-V+NP-Ad δεν προσφέρει κάτι επιπλέον στην περίπτωση των βραγχίων. Κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και με τη διέγερση της IFN $\gamma$  στο έντερο όσο αφορά την ομάδα NP-V+ NP-Ad, με τη διαφορά ότι αυτή είναι εντονότερη στην ομάδα NP-V. Στην περίπτωση των νεφρών και της σπλήνας η ομάδα NP-V προκαλεί μία ελαφρά διέγερση της IFN $\gamma$ , σε αντίθεση με τις άλλες δύο ομάδες και κυρίως της ομάδας NP-V+NP-Ad που προκαλεί και την εντονότερη. Οι ρυθμιστικές κυτταροκίνες IL-10 (ιντερλευκίνη) και TGF- $\beta$  των νεφρών διεγείρονται στατιστικά σημαντικά στην ομάδα NP-V+ NP-Ad συγκριτικά με τις άλλες δύο ομάδες. Η ομάδα NP-V εισάγει έντονη διέγερση των IL-10 και TGF- $\beta$  στο έντερο συγκριτικά με την ομάδα NP-V+NP-Ad.

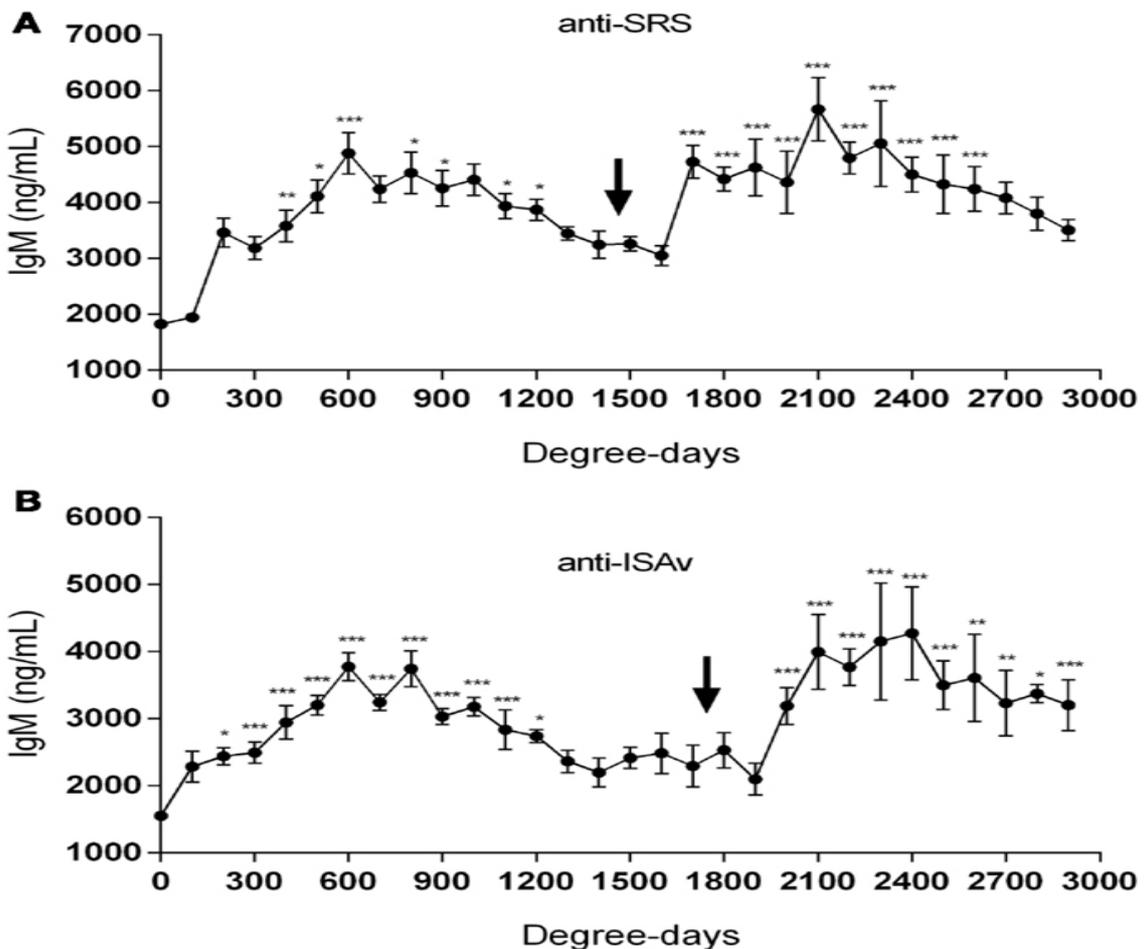
Συμπερασματικά, το εμβόλιο NP-V+NP-Ad διεγείρει την έμφυτη ανοσοβιολογική αντίδραση μέσω της IFN $\alpha$  και την κυτταρική μέσω της IFN $\gamma$  και το έναυσμα για αυτή την απόκριση δίνεται από τη διέγερση των IL-10 και TGF- $\beta$ . Η αξιολόγηση της χυμικής ανοσίας πραγματοποιήθηκε μέσω του προσδιορισμού της συγκέντρωσης των αντισωμάτων στη βλέννα του δέρματος και του εντέρου, στη χολή, στα βράγχια και στον ορό του αίματος, 30 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, μέσω της μεθόδου ELISA. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν καμία διέγερση των αντισωμάτων σε οποιοδήποτε επίπεδο. Το ποσοστό προστασίας (RPS) ανήλθε στο 40,4% για την ομάδα NP-V και στο 78% για την ομάδα NP-V+NP-Ad γεγονός που πιστοποιεί πως το σύνθετο εμβόλιο είναι ικανό να παράσχει υψηλό ποσοστό προστασίας έναντι του παθογόνου ISAV.

***Successive oral immunizations against *Piscirickettsia salmonis* and infectious salmon  
salmonis and infectious salmon anemia virus are required to maintain a long term  
protection in farmed salmonids***

Στην εργασία των (Tobar et al., 2015) μελετήθηκαν τα αποτελέσματα από εμβολιασμένα ψάρια του είδους *Salmo salar* που επελέγησαν από 622 Χιλιανές υδατοκαλλιέργειες κατά την περίοδο 2011-2014. Στόχος της εργασίας ήταν η βελτιστοποίηση του εμβολιαστικού προγράμματος για τις συγκεκριμένες μονάδες υδατοκαλλιέργειών. Τα κριτήρια αποτελεσματικότητας ορίστηκαν σύμφωνα με το ποσοστό συγκέντρωσης της ανοσοσφαιρίνης Μ στον ορό του αίματος και το ποσοστό θνησιμότητας των εμβολιασμένων ψαριών. Αρχικά στα ψάρια εφαρμόστηκε πρωτογενής εμβολιασμός μονοδύναμων ή πολυδύναμων εμπορικών εμβολίων ενάντια στην *Rickettsial septicemia* (SRS) ή στην *infectious salmon anemia* (ISA) (ανάλογα με την μονάδα) με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση των oil-adjuvant αντιγόνων. Κατόπιν ακολούθησαν αναμνηστικές δόσεις μέσω της μεθόδου της δια του στόματος χορήγησης. Το 92% των εμπορικών oral vaccines ήταν μονοδύναμο και το 8% περιείχε και τα δύο προαναφερθέντα αδρανοποιημένα αντιγόνα ενθυλακωμένα σε βιολογικό έλυτρο. Το 42% των μονάδων υδατοκαλλιέργειας προχώρησαν στην εκτέλεση μίας αναμνηστικής δόσης, το 44% προχώρησαν και σε δεύτερη και το 14% έκανε παραπάνω από δύο. Η βιοχημική ανίχνευση της παρουσίας αντισωμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ELISA (Enzyme-linked Immunodorbent Assay).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα συγκεκριμένα αντισώματα IgM αυξάνονται σημαντικά μετά τον εμβολιασμό και παίρνουν την υψηλότερη τιμή τους 600-800 *degree-days* μετά από αυτόν. Μετά από τις 1300 *degree-days* οι τιμές IgM δεν διαφέρουν σημαντικά από τις αντίστοιχες των ανεμβολίαστων ψαριών έναντι των δύο παθογόνων (SRS & ISA). Ως αποτέλεσμα έλαβε μέρος η πρώτη αναμνηστική δόση, μέσω της δια του στόματος χορηγήσεως, η οποία παράτεινε την ανοσοβιολογική αντίδραση κατά 1500 *degree-days* κατά μέσο όρο, διατηρώντας σε ένα ανεκτό επίπεδο τη συγκέντρωση των αντισωμάτων, παρά τη μείωση που παρατηρείται σε αυτήν (1500-2500 ng/mL). Στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή και για τιμές συγκέντρωσης IgM < 2000 ng/mL εμφανίζεται ένα ορολογικό παράθυρο για το παθογόνο SRS που προκαλεί

αύξηση της θνησιμότητας στον πληθυσμό των ψαριών. Η χρήση αντιβιοτικών μετά την πρώτη αναμνηστική δόση του oral εμβολίου δεν απέδωσε και οδήγησε μερικές από τις μονάδες υδατοκαλλιεργειών να προχωρήσουν σε δεύτερη αναμνηστική δόση. Με το πέρασμα της δεύτερης δόσης η συγκέντρωση των αντισωμάτων αυξήθηκε αλλά σχεδόν εξαφανίστηκε μετά από 4000 *degree-days*. Οι ερευνητές ολοκληρώνουν με το συμπέρασμα πως η δια του στόματος χορήγηση του εμβολίου δεν διαφέρει σημαντικά ως προς τη συγκέντρωση αντισωμάτων έναντι της ενδοπεριτοναϊκής έγχυσης. Εν τούτοις το παραπάνω συμπέρασμα δεν αποτελεί αποτρεπτικό παράγοντα για τη μέθοδο της χορήγησης του εμβολίου μέσω του στόματος δεδομένου ότι επιτεύχθηκε η διατήρηση της ανοσοβιολογικής μνήμης χωρίς το εκτρεφόμενο είδος να περάσει εκ νέου από τη στρεσογόνο διαδικασία μίας ενέσιμης αναμνηστικής δόσης.



Εικόνα 6.2. Παρουσιάζεται η κατανομή των αντισωμάτων IgM για τα δύο παθογόνα. Το βέλος δείχνει τη στιγμή που αρχίζει η διαδικασία του oral vaccination όπου φαίνεται η τόνωση της κατανομής αλλά και η σταδιακή πτώση των αντισωμάτων που χρήζει αναγκαίες τις αναμνηστικές δόσεις με oral εμβολιασμό.

***Oral vaccination of first-feeding Atlantic salmon, *Salmo salar* L., confers greater protection against yersiniosis than immersion vaccination***

Η εργασία των (Ghosh *et al.*,2016) αναφέρεται στη μελέτη αντιμετώπισης του ευρέως διαδεδομένου παθογόνου *Yersinia ruckeri* που μολύνει τα εκτρεφόμενα ψάρια από τα πρώτα στάδια της ζωής τους. Η έρευνα προσανατολίζεται σε νεαρά άτομα του είδους *Salmo salar*. Εφαρμόζονται δύο τεχνικές εμβολιασμού, η δια του στόματος χορήγηση και η εμβάπτιση, και ακολουθεί η σύγκριση των δύο τεχνικών. Χρησιμοποιείται ενθυλακωμένο αδρανοποιημένο *Yersinia ruckeri* εμβόλιο (*biopolymeric microencapsulation*) σε άτομα βάρους <0,5 g για την oral διαδικασία. Για τη μέθοδο της εμβάπτισης χρησιμοποιείται η ίδια καλλιέργεια κυττάρων *Yersinia ruckeri* με τη διαφορά ότι δεν υπεισέρχεται στο στάδιο της ενθυλάκωσης.

Τα παθογόνα *Yersinia ruckeri* αδρανοποιούνται με ουδέτερο διάλυμα φορμαλίνης 0.3% του συνολικού βάρους για 24 ώρες. TSA πλακίδια (άγαρ) εμβολιάζονται με 100μL με αδρανοποιημένα βακτήρια εις τριπλούν και επωάζονται στους 18°C για 24 ώρες ώστε να αποφευχθεί η επιστροφή των βακτηρίων στην αρχική τους παθογόνο κατάσταση. Η συγκέντρωση των κυττάρων πραγματοποιείται με φυγοκέντρηση σε 8000 x g για 30 λεπτά και πλένονται δύο φορές σε διάλυμα φωσφορικού άλατος (*phosphate-buffered saline*).

Για τη δια του στόματος χορήγηση τα βακτήρια *Yersinia ruckeri* αφού έχουν υποστεί λύση τότε ενθυλακώνονται σε μικροκάψουλες, οι οποίες περνάνε από τη διαδικασία της λυοφιλοποίησης. Στην ίδια διαδικασία υπόκειται και η εμπορική τροφή μέχρι να λάβει το μισό της βάρους και ακολούθως θρυμματίζεται. Αναμειγνύεται με τις μικροκάψουλες και προκύπτει μία πάστα η οποία αποξηραίνεται και αποτελεί την τροφή για τον oral εμβολιασμό (*treated feed*).

Σύμφωνα με τον σχεδιασμό του πειράματος τα ψάρια διακρίνονται σε 5 κατηγορίες (*groups*). Στην πρώτη βρίσκονται τα ψάρια που λαμβάνουν το oral εμβόλιο (*ORAL*), στη δεύτερη ανήκουν ψάρια που λαμβάνουν το oral εμβόλιο αλλά και μία αναμνηστική δόση μέσω της μεθόδου της εμβάπτισης (*ORAL+DIP*). Στην τρίτη κατηγορία ανήκουν τα ψάρια που εμβολιάζονται μέσω της εμβάπτισης (*1DIP*) και ψάρια που εμβολιάζονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο αλλά λαμβάνουν και μία δεύτερη

δόση αργότερα πάλι με την ίδια μέθοδο (2DIP). Η τελευταία κατηγορία αφορά τα ψάρια που δεν λαμβάνουν καμία θεραπεία (CONTROL GROUP). Κάθε κατηγορία διαχωρίζεται σε 3 δεξαμενές με 26 ψάρια το καθένα. Όλα τα ψάρια σιτίζονται με εμπορική τροφή (*untreated feed*) για 14 ημέρες από τη στιγμή εισαγωγής τους στις δεξαμενές. Για τις κατηγορίες (ORAL) και (ORAL+DIP) ακολουθείται επταήμερη σίτιση με την *treated* τροφή και επταήμερη σίτιση με την *untreated* τροφή, εναλλάξ. Η προαναφερθείσα διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές. Τα ψάρια μολύνονται με τον παθογόνο μικροοργανισμό μέσω της μεθόδου της εμβάπτισης. Συγκεκριμένα, επιλέγονται τυχαία έξι ψάρια από κάθε δεξαμενή, εμβαπτίζονται στο διάλυμα με το παθογόνο και επιστρέφουν στις αντίστοιχες δεξαμενές τους.

Ευδιάκριτες περιοχές της φλουορεσκέινης παρατηρούνται σε νεφρό, συκώτι και σπλήνα των ψαριών που ανήκουν στις κατηγορίες (ORAL) και (ORAL+DIP). Η συγκεκριμένη παρατήρηση οδήγησε στο συμπέρασμα πως πραγματοποιήθηκε η μετακίνηση του *FITC-labelled* εμβολίου στα κρίσιμα ανοσολογικά όργανα των ψαριών. Ο σχετικός δείκτης θνησιμότητας *RPS* ανέρχεται στο 29,4% για την (ORAL) κατηγορία και στο 51% για την κατηγορία (ORAL+DIP) παρουσιάζοντας μία ήπια προστασία έναντι του παθογόνου *Yersinia ruckeri*. Τα ποσοστά που εμφανίζονται στις κατηγορίες (1DIP) και (2DIP) ανέρχονται στο 20,4% και 16,7% αντίστοιχα. Παράλληλα, το *Cumulative Percent Mortality (CPM)* είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερο από τις *untreated* κατηγορίες. Σε όρους *CPM* οι κατηγορίες (1DIP) και (2DIP) δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους αλλά το ίδιο συμβαίνει συγκρινόμενα και με το *Control group*. Σύμφωνα με το τεστ ελέγχου *LogRank* φαίνεται πως ενώ η κατηγορία (ORAL+DIP) είναι σημαντικά διαφορετική από τις κατηγορίες ελέγχου, η κατηγορία (ORAL) δεν διαφέρει από αυτές. Όσο αφορά τη συγκέντρωση των αντισωμάτων, δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά μεταξύ των *treated* κατηγοριών και των *untreated*.

Συνοπτικά, κρίνεται επιτυχής η μεταφορά του ενθυλακωμένου oral εμβολίου στα ανοσολογικά όργανα. Είναι ξεκάθαρο πως η oral διαδικασία παρουσιάζει μικρότερη αθροιστική κατανομή θνησιμότητας συγκριτικά με τις *untreated* μεθόδους. Επιπρόσθετα, η θνησιμότητα που εμφανίζεται μεταξύ των δύο κατηγοριών της μεθόδου εμβάπτισης δεν είναι στατιστικά σημαντική γεγονός που φανερώνει ότι η

αναμνηστική δόση δεν έδωσε τελικά την απαραίτητη ώθηση στην ανοσοβιολογική μνήμη. Σε αντίθεση, συνεισέφερε σημαντικά στη βελτίωση της oral κατηγορίας.

Η κοινή παραδοχή πως το ειδικό ανοσοβιολογικό σύστημα δεν είναι αναπτυγμένο στα πρώιμα στάδια της ζωής των ψαριών απαντά στην αποτυχία της δεύτερης δόσης στην *untreated* κατηγορία με τη λογική ότι ναι μεν η πρώτη εμφάνιση κατάφερε να προκαλέσει την ανοσοβιολογική απόκριση αλλά σε συνδυασμό με το άγουρο ανοσοβιολογικό σύστημα δεν υπήρξε, στη συνέχεια, η αναμενόμενη βελτίωση με τη δεύτερη εμφάνιση. Στην περίπτωση όμως της κατηγορίας (*ORAL+DIP*), η βελτίωση των αποτελεσμάτων σε όρους RPS φαίνεται να σχετίζεται με τη μικροενθυλάκωση του εμβολίου σε μεμβράνες αλγινικού. Το αλγινικό (*alginate*) είναι γνωστό ανοσοδιεγερτικό και σε αυτό το σημείο μπορεί να κρύβεται η επιτυχία της αναμνηστικής μεθόδου στον oral εμβολιασμό. Σύμφωνα με τους συγγραφείς θα έπρεπε να δημιουργηθεί άλλο ένα *challenge group* όπου μικροκάψουλες αλγινικού θα χορηγούνταν στα ψάρια χωρίς να περιέχουν όμως το εμβόλιο ώστε να επιβεβαιωθεί ή όχι η παραπάνω υπόθεση.

***An oral chitosan DNA vaccine against nodavirus transcription of cell-mediated cytotoxicity and interferon genes in the european sea bass juveniles gut and survival upon infection***

Τα *Chitosan* νανοσωματίδια, εξαιτίας των φυσικών χαρακτηριστικών τους φαίνεται πως είναι μία ιδανική λύση για όλα τα είδη εμβολίων όπως και τα αντίστοιχα DNA. Συγκεκριμένα δεν είναι τοξικά για τα ψάρια, ούτε για τον άνθρωπο. Επιπλέον, η θετικά φορτισμένη επιφάνειά τους και η πολύπλοκη σταθερότητά τους στις συνθήκες pH επιτρέπει την προστασία του ενθυλακωμένου πλασμιδίου DNA. Επιπρόσθετα, δρουν και ανοσοδιεγερτικά με την ικανότητά τους να εγκλωβίζουν και να προστατεύουν τα αντιγόνα στον πεπτικό σωλήνα των ψαριών.

Τα παραπάνω αποτέλεσαν το εφαλτήριο της εργασίας των (*Valero et al.,2016*). Εμβολιάστηκαν μέσω του στόματος νεαρά άτομα του είδους *Dicentrarchus labrax* με DNA εμβόλιο έναντι του *NNV (nodavirus)*, το οποίο ενθυλακώνεται μέσα σε *Chitosan* νανοσωματίδια. Σκοπός της εργασίας είναι να ελεγχθεί εάν το εμβόλιο διεγείρει το ανοσοβιολογικό σύστημα στον πεπτικό σωλήνα των ψαριών και μειώνει τον ρυθμό

θνησιμότητας. Η έκφραση του γονιδίου μέσω της καψιδιακής πρωτεΐνης από το στέλεχος Ig/411/96 με γενότυπο *RGNNV*, κλωνοποιείται σε *E. coli*, καθαρίζεται μέσω της διαδικασίας της φυγοκέντρησης για την εξάλειψη των κυτταρικών θραυσμάτων και ενθυλακώνεται στα *chitosan* νανοσωματίδια. Κατόπιν ακολουθεί η ανάμειξη του εμβολίου με την εμπορική τροφή, μέσω ψεκασμού, με μέση δόση 10 μg DNA/ψάρι.

Δημιουργήθηκαν 4 πειραματικές κατηγορίες βασισμένες σε μία εμπορική τροφή (*pellets*). Η πρώτη ομάδα σιτιζόταν αποκλειστικά με την εμπορική τροφή (*control*), η δεύτερη με την ίδια τροφή εμπλουτισμένη όμως με *chitosan* νανοσωματίδια (*CP*), η τρίτη ότι και η δεύτερη συν το άδειο πλασμίδιο DNA (*CP-pcDNA*) και η τελευταία περιείχε ότι και το εμβόλιο της τρίτης ομάδας συν το *NNV* DNA εμβόλιο (*CP-pNNV*).

Τρεις μήνες μετά τον εμβολιασμό ξεκίνησε η περίοδος της δοκιμασίας, όπου 24 ψάρια από κάθε κατηγορία επιλέχθηκαν τυχαία και χορηγήθηκε σε αυτά με ενδοπεριτοναϊκή ένεση το στέλεχος *Nodavirus* (πειραματική μόλυνση). Από εκείνη τη στιγμή ξεκίνησε η καθημερινή καταγραφή των αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας ως δείκτη μέτρησης τον *RPS*.

Η ικανότητα ενθυλάκωσης των *chitosan* nanoparticles κυμάνθηκε από το 84,71% έως το 97,47% του συνολικό DNA πλασμιδίου. Η ανάλυση των επιπέδων της IgM (εξετάσεις αίματος) μετά τις 90 μέρες από τον εμβολιασμό δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 4 κατηγορίες, δηλαδή η εκάστοτε τεχνική δεν προσέφερε κάτι παραπάνω ως προς την παραγωγή αντισωμάτων IgM. Ωστόσο, το εμβόλιο (*CP-pNNV*) φαίνεται πως αυξορρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρομεσολαβούμενη κυτταροτοξικότητα (*TCRb* και *CD8a*) και τις ιντερφερόνες (*IFN*, *MX*, *IFNg*). Θνησιμότητα άρχισε να καταγράφεται από την 3<sup>η</sup> ημέρα στην ομάδα (*control*) μετά το ενέσιμο challenge και έφτασε στο 100% στην 19<sup>η</sup> ημέρα. Για την ομάδα (*CP*), καταγράφηκε 100% θνησιμότητα στην 21<sup>η</sup> ημέρα. Ενώ η πρώτη καταγραφή θανάτου για την ομάδα (*CP-pcDNA*), έγινε στην 17<sup>η</sup> ημέρα και στην 22<sup>η</sup> έφθασε στο 100%. Όσο αφορά την τελευταία ομάδα (*CP-pNNV*), ο πρώτος θάνατος καταγράφηκε στην 22<sup>η</sup> ημέρα χωρίς ευδιάκριτα σημάδια της ασθένειας και στο τέλος του challenge ο δείκτης *RPS* ανήλθε στο 45%. Συμπερασματικά, το ενθυλακωμένο *chitosan* DNA εμβόλιο προστατεύει μερικώς τα ψάρια του είδους *Dicentrarchus labrax*

από την ασθένεια *nodavirus*, λαμβάνοντας όμως υπόψη πως η πειραματική δόση με το στέλεχος του ιού ήταν πολύ ισχυρή, ενώ το τελικό RPS 45% υπολογίστηκε με το πέρασ 3 μηνών από τη στιγμή του εμβολιασμού όταν σε άλλες μελέτες υπολογίζεται σε πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα.

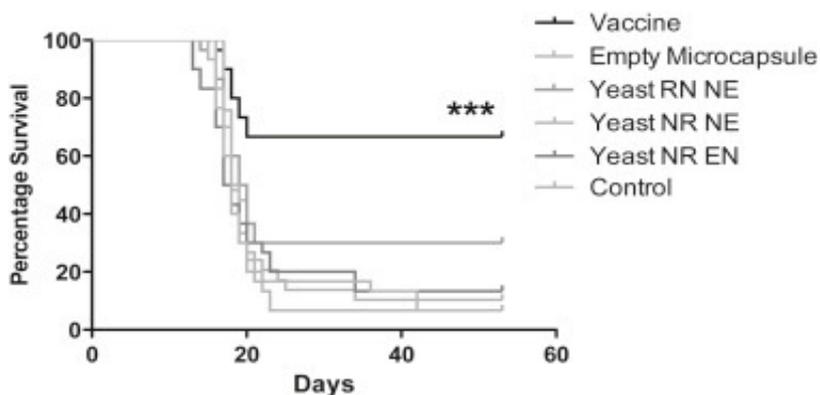
#### ***Protective oral vaccination against infectious salmon anaemia virus in Salmo salar***

Στην παρούσα εργασία των (Caruffo M. et al.,2016) παράγεται ένα εμβόλιο σε σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* με τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA ώστε να αντιμετωπιστεί η λοιμώδης αναιμία των Σολομοειδών (ISA). Τα αντιγόνα συνίστανται από τα κατάλληλα επιλεγμένα τμήματα του ιογενούς *hemagglutinin-esterase (HE)* και την επιφάνεια *fusion πρωτεϊνών* που έχουν εκφραστεί και καθαριστεί από τον σακχαρομύκητα και ενθυλακώνονται σε ένα πολυσακχαριτικό έλυτρο. Η έρευνα επικεντρώνεται σε υγιή νεαρά άτομα μέσου βάρους 40 g του είδους *Salmo salar*.

Το πείραμα περιλαμβάνει 12 ομάδες ψαριών βάρους 40 g. Έξι ομάδες αποτελούν τα *challenge groups* και έξι ομάδες τα αντίστοιχα *controls*. Κάθε δεξαμενή περιέχει 55 ψάρια. Οι ομάδες που συγκροτούνται έχουν τα εξής χαρακτηριστικά: η πρώτη ομάδα έχει εμβολιαστεί με το ενθυλακωμένο ανασυνδυασμένο εμβόλιο με τα *ISAV* αντιγόνα (*Vaccine*), η δεύτερη ομάδα έχει εμβολιαστεί με το ανασυνδυασμένο μη ενθυλακωμένο εμβόλιο με τα *ISAV* αντιγόνα (*Yeast RN NE*), η τρίτη έχει εμβολιαστεί με το μη ενθυλακωμένο μη ανασυνδυασμένο εμβόλιο χωρίς τα αντιγόνα *ISAV* (*Yeast NR NE*), η τέταρτη με το ενθυλακωμένο μη ανασυνδυασμένο εμβόλιο χωρίς τα αντιγόνα *ISAV* (*Yeast NR EN*), η πέμπτη ομάδα έχει το εμβόλιο με τις κενές μικροκάψουλες (*Empty P*) και η τελευταία ομάδα είναι η ομάδα αναφοράς όπου απλώς η τροφή επικαλύπτεται με έλαιο (*Control*). Η μόλυνση με το παθογόνο *ISAV* έλαβε μέρος με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση στις 450 *degree DPV* (*Days Post Vaccination*) και μόνο για τις ομάδες του *challenge group*. Η θνησιμότητα καταγράφεται καθημερινά, η νεκροψία χρησιμοποιείται ως μέθοδος διάγνωσης της ασθένειας και τα ευρήματά της επιβεβαιώνονται μέσω της ανάλυσης PCR. Για την αξιολόγηση της πιθανής παραγωγής

αντισωμάτων, η οποία γίνεται με τη μέθοδο *ELISA*, πραγματοποιούνται αιμοληψίες σε 3 ψάρια ανά ομάδα και σε διαφορετικές χρονικές περιόδους (πριν και μετά τον εμβολιασμό και 150, 300, 500, 630 και 740 *DD post vaccination*). Για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου λαμβάνονται δειγματοληπτικά ιστοί από το νεφρό στον ίδιο αριθμό ψαριών και στις ίδιες χρονικές στιγμές όπου πραγματοποιούνται οι αιμοληψίες.

Η ομάδα (*Vaccine*) παρουσιάζει  $RPS = 64.3\%$ ,  $ARR$  (*Absolute Risk Reduction*) = 60% και  $NNT$  (*Number necessary to treat*) = 2. Για την ομάδα (*Yeast RN NE*) τα αντίστοιχα ποσοστά ανέρχονται σε 25%, 23.3% και 5% και για τις υπόλοιπες ομάδες τα ποσοστά είναι ακόμα χαμηλότερα. Επομένως, το (*Vaccine*) είναι σημαντικά διαφορετικό από τις υπόλοιπες ομάδες και καταδεικνύει πως η συγκεκριμένη φόρμουλα είναι ικανή να προσφέρει επαρκή προστασία στα ψάρια. Παράλληλα, οι καμπύλες θνησιμότητας που καταγράφηκαν στις μη ενθυλακωμένες ομάδες συμπεριλαμβάνοντας και την ομάδα αναφοράς δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.



Εικόνα 6.3 Παρουσιάζεται διαγραμματικά ο δείκτης RPS των διαφορετικών πειραματικών θεραπειών αφού έχουν μολυνθεί ενδοπεριτοναϊκά με το παθογόνο. Προς διευκόλυνση παρατίθενται οι συντομώσεις RN:recombinant, NR:non-recombinant, EN:encapsulated, NE:non-encapsulated

Η oral ανοσοποίηση των ενθυλακωμένων αντιγόνων προκαλεί σημαντική διέγερση των αντισωμάτων IgM στην περίπτωση των ομάδων που δέχτηκαν ενέσιμα το παθογόνο (*challenged groups*) αλλά και στην περίπτωση των *unchallenged groups*. Οι συγγραφείς αναφέρουν πως λόγω έλλειψης αναλυτικών μεθόδων δεν μπόρεσαν να προχωρήσουν στην ποσοτικοποίηση των αντισωμάτων IgT του βλεννογόνου μεταθέτοντας την σε μελλοντική εργασία. Επιπρόσθετα, έθεσαν ως όργανο στόχο για τη διέγερση του φυσικού ανοσοβιολογικού συστήματος τον πρόνεφρο (*Head-Kinney*),

μιας και αποτελεί το κύριο μέρος παραγωγής Β-λεμφοκυττάρων. Πράγματι παρατήρησαν μία ισχυρή επαγωγή της *Mx* πρωτεΐνης στα *challenged groups* κάτι που δεν συμβαίνει στα *unchallenged*. Ως συνέπεια του προαναφερθέντος συμπεράσματος περιόρισαν τη μελέτη στα *challenged groups* και διαπίστωσαν πως η επαγωγή της *Mx* δεν είναι στατιστικά σημαντική μεταξύ αυτών των *groups*, γεγονός που σημαίνει ότι για την επαγωγή δεν παίζει κάποιο ρόλο η εκάστοτε φόρμουλα του εμβολίου αλλά έχει να κάνει αποκλειστικά με τη μόλυνση του παθογόνου *ISAV*. Οι συγγραφείς διατηρούν την επιφυλακτικότητά τους ως προς το βαθμό σύγκρισης της δικής τους εργασίας με αντίστοιχες άλλες που αναφέρονται στο είδος *Salmo salar* εξαιτίας του απομονωμένου στελέχους του ιού που εντοπίζεται στη Χιλή σε αντίθεση με τις υπόλοιπες εργασίες που απομονώνουν Νορβηγικά στελέχη.

#### ***Comparison of lacZ reporter gene expression in gilthead sea bream (Sparus aurata) following oral or intramuscular administration of plasmid DNA in chitosan nanoparticles***

Στην εργασία των (Saez M.I. et.al., 2017) αποτιμάται η δια του στόματος χορήγηση εμβολίου βασισμένου σε chitosan μικροκάψουλες πλασμιδίου DNA (*pDNA*) σε νεαρά άτομα τσιπούρας (*Sparus aurata*). Το πλασμίδιο *pCMVβ* ενθυλακώνεται σε *chitosan* μικροκάψουλες με στόχο την αξιολόγηση της ικανότητας των αδρανών καψουλών να συγκρατούν και να προστατεύουν το *pDNA* από τις *in vitro* συνθήκες μιμούμενα το κοιλιακό περιβάλλον του ψαριού. Η αποτίμηση και η αποτελεσματικότητα της συγκεκριμένης τεχνικής επιτυγχάνεται μέσω της εφαρμογής της ενδομυϊκής χορήγησης του εμβολίου και κατόπιν της σύγκρισης των δύο τεχνικών (*oral + intramuscular*) ως προς την ανίχνευση του πλασμιδίου στους ιστούς των ψαριών. Μελετάται, επίσης, η ανίχνευση του γονιδίου αναφοράς *lacZ* (*β-galactosidase activity*) μετά τη χορήγηση του γυμνού (*naked pDNA*) και μικρο-ενθυλακούμενου (*nano-encapsulated pDNA*) εμβολίου, μέσω του οποίου ποσοτικοποιείται η γονιδιακή έκφραση. Συγκεκριμένα, αποτιμάται η μεταφορά του εξωγενούς *pDNA*, από το σημείο εισόδου, στους διαφορετικούς ιστούς του ψαριού (συκώτι, έντερο, μύες). Το γονίδιο αναφοράς ενσωματώνεται στην ευκαρυωτική έκφραση του φορέα *pCMVβ*. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να επισημανθεί πως η δια του στόματος χορήγηση έγινε μέσω

διασωλήνωσης αφού πρώτα είχε απομακρυνθεί η βελόνα και τα εύκαμπτα φτερά και όχι μέσω της τροφής που έχουμε συναντήσει έως τώρα.

Εξετάζεται *in vitro* η σταθερότητα των *chitosan-pDNA nanoparticles* τόσο σε επίπεδο οξύτητας (*ph*) όσο και σε επίπεδο πεπτικών νουκλεασών (*digestive nucleases*). Πρόκειται για τους δύο λόγους που οδηγούν σε υποβάθμιση της προστασίας του εμβολίου στην πεπτική οδό. Ξεκινώντας από την οξύτητα παρατηρήθηκε, στην τιμή *ph* = 2, γρήγορη υδρόλυση του *naked-pDNA*, ενώ ήταν σταθερό στο ουδέτερο και στο αλκαλικό περιβάλλον με τιμές *ph* =7 και *ph* =9 αντίστοιχα. Ο ίδιος έλεγχος πραγματοποιήθηκε και στο *encapsulated-pDNA* όπου τα *chitosan complexes* φάνηκαν να προστατεύουν το *pDNA* στις μικρές τιμές. Αντίστοιχη εικόνα ως προς την αποτελεσματικότητα ανάμεσα στο *naked-pDNA* και στο *encapsulated-pDNA* παρατηρήθηκε και στον έλεγχο των πεπτικών νουκλεασών. Συγκεκριμένα το *naked-pDNA* υπέστη γρήγορη υδρόλυση. Συγκριτικά με την *in vitro*, τα αποτελέσματα της *in vivo* μελέτης δεν φαίνεται να ταυτίζονται απόλυτα, κάτι ίσως μη αναμενόμενο. Οι συγγραφείς αναφέρουν, επικαλούμενοι τη βιβλιογραφία, ότι οι λόγοι που οδηγούν στο να μην δουλεύουν το ίδιο καλά οι *in vitro* φόρμουλες στους ζωντανούς οργανισμούς δεν είναι ακόμα απόλυτα κατανοητοί.

300 νεαρά άτομα του είδους *Sparus aurata* (20+/-5 g) χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των διαφορετικών στρατηγικών χορήγησης *pDNA*. Τα νεαρά άτομα τσιπούρας χωρίστηκαν σε 4 πειραματικές ομάδες συν την ομάδα αναφοράς (*Control group*). Κατανεμήθηκαν σε 15 δεξαμενές (5 ομάδες x 3 δεξαμενές για κάθε ομάδα x 20 ψάρια ανά δεξαμενή). Όλα τα ψάρια εκτός από αυτά της ομάδας αναφοράς έλαβαν ισόποσες ποσότητες *pDNA*. Η πρώτη ομάδα (*ORAL-naked*) έλαβε από του στόματος *naked-pDNA*, δηλαδή μη ενθυλακωμένο σε *chitosan nanoparticles*. Η δεύτερη ομάδα (*ORAL-nano*) έλαβε από του στόματος το *pDNA* αφού αυτό είχε παγιδευτεί εντός των *chitosan nanoparticles*. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και με την ενδομυϊκή ένεση δημιουργώντας τις αντίστοιχες ομάδες (*IM-naked*) και (*IM-nano*). Κατόπιν τα ψάρια επέστρεψαν στις αντίστοιχες δεξαμενές. Ακολούθησε δειγματοληψία πέντε ψαριών από κάθε ομάδα θεραπείας στην 7<sup>η</sup>, 15<sup>η</sup>, 30<sup>η</sup> και 60<sup>η</sup> ημέρα μετά τον εμβολιασμό. Τα ψάρια θανατώθηκαν με υπερβολική δόση αναισθητικού και

ελήφθησαν από αυτά το άνω μέρος της πεπτικής οδού, το συκώτι και τμήμα των μυών από τα ραχιαία πτερύγια (δηλαδή από το ενέσιμο και το μη ενέσιμο σημείο).

Σχετικά με την *in vitro* αξιολόγηση, το σκανάρισμα των *chitosan nanoparticles* με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξε ομοιογένεια, σφαιρικότητα, σταθερότητα και αξιοσημείωτη ικανότητα ενθυλάκωσης. Σχετικά με την *in vivo* αξιολόγηση και την ανίχνευση του πλασμιδίου στους ιστούς των ψαριών, οι ακολουθίες του *pCMVβ* δεν ανιχνεύονται στην ομάδα αναφοράς (*Control*) και στην ομάδα (*ORAL-naked*). Στην ομάδα *IM-naked* ανιχνεύθηκαν ακολουθίες του *pCMVβ* στους μύες αλλά όχι στο συκώτι και στο έντερο. Στην ομάδα *IM-nano* τα αποτελέσματα ήταν καλύτερα συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα του *IM-naked* αφού οι ακολουθίες του *pCMVβ* εντοπίστηκαν στο συκώτι όχι όμως και στο έντερο. Στην ομάδα της δια του στόματος χορήγησης με το ενθυλακωμένο *pDNA* (*ORAL-nano*) ανιχνεύθηκε το *pCMVβ* σε όλους τους προς εξέταση ιστούς του ψαριού.

Δεν ανιχνεύθηκε η *β-gal* δραστηριότητα στους ιστούς των ψαριών για τις ομάδες αναφοράς και *ORAL-naked*. Αποκαλύπτεται πως στις ομάδες *IM-naked* και *IM-nano* το μεγαλύτερο μέρος της έκφρασης της *β-gal* εντοπίζεται κυρίως στο σημείο όπου έγινε η ένεση. Παρ' όλα αυτά η *IM-nano* στρατηγική εμφανίζει υψηλότερη *β-gal* δραστηριότητα στο συκώτι σε σχέση με την *IM-naked*. Όσο αφορά την *ORAL-nano* εντοπίζεται υψηλότερη *β-gal* δραστηριότητα στο έντερο και στο συκώτι συγκριτικά με τις *IM* στρατηγικές. Η *β-gal* δραστηριότητα της *ORAL-nano* στους μύες βρίσκεται στα ίδια επίπεδα με την αντίστοιχη των *IM* στρατηγικών στο ενέσιμο σημείο.

Εν κατακλείδι, η συγκεκριμένη εργασία δείχνει ότι το πλασμίδιο DNA που χορηγείται από το στόμα είναι ικανό να ξεπεράσει τα εμπόδια της πεπτικής οδού, σύμφωνα με τα *in vitro* και *in vivo* πειράματα, και να ενεργοποιήσει την έκφραση του γονιδίου αναφοράς στα εσωτερικά όργανα. Ο χρόνος του πειράματος ορίστηκε στις 60 ημέρες από τη στιγμή του εμβολιασμού και η ανίχνευση του πλασμιδίου παρέμεινε σταθερή κατά τη διάρκειά του, τόσο για την *IM-nano* όσο και για την *ORAL-nano* ομάδα, με ισόποση ποσότητα πλασμιδίου, δηλαδή δεν χρειάστηκε μεγαλύτερη δόση για την oral διαδικασία όπως υποστηρίζουν άλλες μελέτες. Επιπρόσθετα, αποδείχτηκε πως τα *chitosan nanoparticles* είναι αποδοτικά και ως προς τη χορήγηση εμβολίου από το

στόμα αλλά και ως προς την ικανότητα απορρόφησης του *pDNA*. Τελικά, αποδεικνύεται σε μία ακόμη μελέτη πως όσο μικρότερο είναι το μέγεθος του φορέα τόσο υψηλότερη είναι και η ικανότητα μετασχηματισμού του γονιδίου.

***Feed pellets containing chitosan nanoparticles as plasmid DNA oral delivery system for fish:  
In vivo assessment in gilthead sea bream (Sparus aurata) juveniles***

Η εργασία των (Saez et al.,2018) αποτελεί μία συνέχεια της αντίστοιχης εργασίας των ίδιων ερευνητών (Saez et al.,2017). Στην προηγούμενη μελέτη τους η oral διαδικασία έγινε μέσω διασωλήνωσης αφού προηγουμένως είχε αφαιρεθεί η βελόνα και τα εύκαμπτα φτερά. Στην παρούσα εργασία οι συγγραφείς επισημαίνουν πως η μέθοδος της διασωλήνωσης για τη μεταφορά του εμβολίου να μεν κρίνεται ακριβέστερη ως προς την ποσότητα του χορηγούμενου εμβολίου, κάνει ευκολότερη τη μελέτη των φυσιολογικών δεδομένων των οργανισμών και εξασφαλίζει την επιτυχή μεταφορά και κατανομή του πλασμιδίου *pDNA*, παρ' όλα αυτά είναι αδύνατο να εφαρμοστεί σε ένα μεγάλο πλήθος ψαριών σε μία μονάδα εντατικής εκτροφής. Συνεπώς, στην παρούσα εργασία ακολουθούν τη λογική χορήγησης του εμβολίου μέσω της τροφής.

Η τροφή παρασκευάζεται σύμφωνα με τα συνήθη διατροφικά συστατικά και αναμειγνύεται με τα *chitosan nanoparticles* στα οποία εγκλωβίζεται το πλασμίδιο DNA (*pCMVβ*) εκφρασμένο σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Το πλασμίδιο χαρακτηρίζεται από την εισαγωγή του γονιδίου αναφοράς *lacZ* που κωδικοποιεί το βακτηριακό ένζυμο *β-galactosidase (β-gal)* και παρέχεται δια του στόματος σε νεαρά ιχθύδια του είδους *Sparus aurata*. Για σκοπούς *in vivo* αξιολόγησης του oral εμβολιασμού παρέχεται ενδομυϊκά σε άλλη ομάδα ψαριών ισόποση δόση πλασμιδίου *pCMVβ*. Η πιθανή έκφραση του γονιδίου αναφοράς γίνεται με *in situ* ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της δραστηριότητας του *β-gal* ενζύμου στους ιστούς των ψαριών καθώς επίσης και με την τιτλοδότηση των αντισωμάτων IgM έναντι της *β-gal* πρωτεΐνης που πιθανόν να εντοπίζεται στα δείγματα αίματος.

240 ιχθύδια τσιπούρας διαχωρίζονται σε 3 πειραματικές ομάδες, κατανεμημένα σε 12 δεξαμενές (4 ομάδες x 3 δεξαμενές ανά ομάδα x 20 ψάρια ανά δεξαμενή), και

μία ομάδα αναφοράς (*CONTROL*). Στην ομάδα *nano-feed* τα ψάρια ταΐζονται για μία μόνο μέρα με την τροφή που περιέχει τα *pDNA chitosan-nanoparticles* σε δύο δόσεις εντός 24ωρου. Από εκείνο το σημείο έως και το τέλος του πειράματος (60 ημέρες) τα ψάρια ταΐζονται με την *control-feed*, δηλαδή την απλή τροφή που δεν περιέχει το ενθυλακωμένο πλασμίδιο. Στην ομάδα *IM-pDNA* εντάσσονται τα ιχθύδια που έλαβαν τη δόση γυμνού *pDNA* (όχι ενθυλακωμένο) ενδομυϊκά στο δεξί ραχιαίο μυ. Η τρίτη πειραματική ομάδα *IM-β-gal* αποτελείται από ψάρια που εμβολιάστηκαν ενδομυϊκά με 10μg εμπορικής *β-galactosidase* ως αντιγόνο. Η διάρκεια του πειράματος ολοκληρώνεται στις 60 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος όλες οι ομάδες ψαριών τρέφονται με *control-feed*.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος και συγκεκριμένα την 15<sup>η</sup>, 30<sup>η</sup> και 60<sup>η</sup> ημέρα μετά τον εμβολιασμό πραγματοποιείται δειγματοληψία πλήθους 5 ψαριών από κάθε ομάδα με τη μέθοδο *ELISA* και κατόπιν θανατώνονται ώστε να ξεκινήσει ο ιστολογικός έλεγχος. Λαμβάνονται μέρη από το συκώτι, το έντερο και από τους ραχιαίους μύες και από τις δύο πλευρές (όχι μόνο από το ενέσιμο σημείο).

Ο έλεγχος των μικροκαψουλών πραγματοποιείται σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο όπου ελέγχεται η διάμετρός τους, η σφαιρικότητά τους καθώς επίσης και η αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης του πλασμιδίου σε αυτές. Η ικανότητα ενθυλάκωσης του πλασμιδίου ανέρχεται στο 99% γεγονός που υποδηλώνει πως η διαδικασία πολυμερισμού παγιδεύει ολόκληρο το *pDNA* εντός των *chitosan nanoparticles*.

Δεν εντοπίστηκε πλασμίδιο *pCMVβ* στους ιστούς των ψαριών της ομάδας αναφοράς (*Control*) σε καμία χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια του πειράματος. Αντιθέτως, ακολουθίες *pCMVβ* ανιχνεύθηκαν σε όλες τις χρονικές στιγμές της δειγματοληψίας στους μύες, συκώτι και οπίσθιο έντερο της ομάδας *nano-feed*. Στην ομάδα *IM-pDNA* ανιχνεύθηκαν μόνο στους μύες.

Η *β-gal* δραστηριότητα εντοπίστηκε κυρίως στο σημείο όπου εφαρμόστηκε η ένεση για την ομάδα *IM-pDNA*, ενώ ελάχιστη ήταν αυτή που παρατηρήθηκε στους υπόλοιπους ιστούς. Σε αντίθεση, στην ομάδα *nano-feed* βρίσκεται εν αφθονία η *β-gal* δραστηριότητα σε όλους τους ιστούς των οργάνων καθ' όλη τη διάρκεια του

πειράματος. Για την ομάδα αναφοράς και για την *IM-β-gal* δεν ανιχνεύθηκε καμία δραστηριότητα σε όλες τις χρονικές στιγμές του πειράματος. Αντίστοιχα ήταν τα αποτελέσματα για την *in situ* ανίχνευση της *β-gal* που πραγματοποιήθηκε στην 30<sup>η</sup> ημέρα μετά τον εμβολιασμό, με μία μόνο διαφορά, στη σημαντικά μικρότερη δραστηριότητα του oral εμβολιασμού στους μύες συγκριτικά με την *in vivo* μελέτη.

Όλες οι πειραματικές ομάδες προκαλούν τη χυμική ανοσία παρ' όλα αυτά η ένταση και η ταχύτητα της απόκρισης ποικίλλει ανάλογα με τη μέθοδο χορήγησης του εμβολίου καθώς και το υλικό από το οποίο αποτελείται. Η συγκέντρωση των αντισωμάτων που μετρείται στην 15<sup>η</sup> ημέρα δείχνει ότι οι ομάδες *nano-feed* και *IM-β-gal* βρίσκονται στα ίδια επίπεδα ενώ μετά την 30<sup>η</sup> ημέρα ξεκινά η διαφοροποίησή τους, μάλιστα σε αυτό το σημείο τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αντισωμάτων την παρουσιάζει η ομάδα *IM-pDNA*. Ενώ φαίνεται πως η ταχύτερη και η εντονότερη παραγωγή αντισωμάτων προκαλείται από την ομάδα *IM-pDNA*, τελικά με το πέρας των 30 ημερών η παραγωγή φθίνει και καταλήγει χαμηλότερη από την αντίστοιχη της *nano-feed* στην 60<sup>η</sup> ημέρα. Επομένως είναι ξεκάθαρο πως η oral διαδικασία υπερτερεί και στην περίπτωση της παραγωγής των αντισωμάτων.

Οι συγγραφείς κατέληξαν πως η δια του στόματος χορήγηση του εμβολίου είναι ανεφάρμοστη με τη μέθοδο της διασωλήνωσης και για αυτό το λόγο καταφεύγουν στην ενθυλάκωση του DNA στην τροφή. Επίσης, η μίξη του *pDNA* με την τροφή αφού πρώτα έχει ενθυλακωθεί στα *chitosan nanoparticles* αποτελεί έναν ικανό τρόπο χορήγησης του εμβολίου από του στόματος γεγονός που αποδείχθηκε πειραματικά, αφού δεν υποβαθμίστηκε κατά τη φάση επεξεργασίας της τροφής και από τα υγρά της πεπτικής οδού. Ένα ακόμα συμπέρασμα που προέκυψε σχετίζεται με την DNA δόση του εμβολίου η οποία ήταν ισόποση με την αντίστοιχη ενδομυϊκή ένεση, καθώς επίσης και η *β-gal* δραστηριότητα που μετρήθηκε στο συκώτι και στο έντερο μετά την oral χορήγηση ήταν συγκρίσιμη με την αντίστοιχη που προέκυψε στον μυ όπου εφαρμόστηκε η ένεση.

***A novel "in-feed" delivery platform applied for oral DNA vaccination against IPNV enables high protection in Atlantic salmon (Salmo salar)***

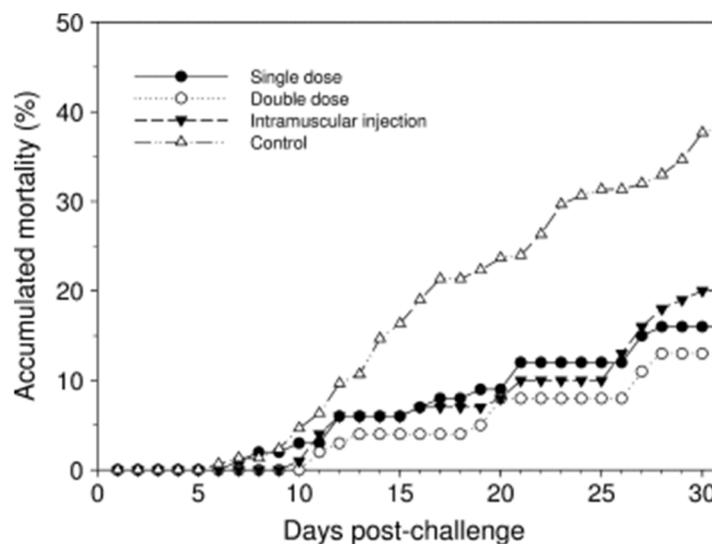
Στην εργασία των (Reyes M. et al.,2017) χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του DNA εμβολίου για την αντιμετώπιση της λοιμώδους νεκρωτικής παγκρεατίτιδας (IPNV) στο είδος *Salmo salar*. Συγκεκριμένα πρόκειται για ένα ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό DNA εμβόλιο το οποίο τυπικά περιέχει ένα γονίδιο που κωδικοποιεί την κάψα (έλυτρο) της δομικής πρωτεΐνης VP2 του ιού. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια εισάγονται στο βακτήριο *E. coli* προκειμένου να εκφραστούν οι γενετικές πληροφορίες που υπάρχουν σε αυτά. Για τη δια του στόματος χορήγηση των εμβολίων μέσω της τροφής χρησιμοποιήθηκε η χρήση λιποσωμάτων (*liposome DNA vaccine*) ως φορέα. Η διαδικασία του πειράματος έγκειται στην ενσωμάτωση του *liposomal DNA εμβολίου* στην τροφή, στο είδος της ανοσοποίησης και στην κατηγοριοποίηση των ψαριών σε ομάδες, και τέλος στη σύγκριση μεταξύ τους.

Η ενσωμάτωση του εμβολίου στην τροφή πραγματοποιείται με τη βοήθεια δύο καναλιών. Το πρώτο μεταφέρει την τροφή ενώ το δεύτερο αποτελείται από δύο σωληνώσεις, όπου στη μεν πρώτη υπάρχει το εμβόλιο και στη δεύτερη το *feed-grade oil*. Η τροφή πέφτει στον αναδευτήρα ελαίου όπου σε συνθήκες κενού ο αέρας εξαναγκάζεται να βγει από την τροφή. Ταυτόχρονα, το *liposome DNA* εμβόλιο ψεκάζεται πάνω στα *pellets* τροφής σε συνθήκες κενού, ο αέρας επιστρέφει στον αναδευτήρα βοηθώντας το να διαπεράσει και να εισχωρήσει στην τροφή. Το *feed-grade oil* ψεκάζεται στην τροφή σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης δημιουργώντας ένα προστατευτικό ελαιώδες φιλμ (*top coating process*) γύρω από την τροφή.

Δημιουργήθηκαν 4 μέθοδοι θεραπείας, δηλαδή τρεις ομάδες ψαριών και μία ομάδα αναφοράς. Στην πρώτη ομάδα έγινε μία δόση του 1 mg/Kg με χορήγηση από το στόμα. Στη δεύτερη ομάδα χορηγήθηκε η διπλή δόση 2 mg/kg με τον ίδιο τρόπο. Η τρίτη ομάδα εμβολιάστηκε ενδομυϊκά με DNA εμβόλιο 5mg/kg. Η τέταρτη και τελευταία ομάδα αποτέλεσε το *control group* με ανεμβολίαστα ψάρια. Με το πέρας 68 ημερών ανοσοποίησης, 50 ψάρια από κάθε μέθοδο θεραπείας αναμείχθηκαν με 50 από το *control group*, (x2 φορές – δηλαδή δημιουργήθηκαν 6 ομάδες).

Η μελέτη έδειξε πως η δια του στόματος χορήγηση του εμβολίου δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των ψαριών, δηλαδή δεν επιδρά στο ποσοστό αφομοίωσης των θρεπτικών συστατικών. Παράλληλα, οι ιστολογικές μελέτες δεν έδειξαν καμία αρνητική

επίδραση στο πάγκρεας και στο συκώτι των ψαριών. Τα *IPNV* αντισώματα που ανιχνεύθηκαν στην πρώτη ομάδα θεραπείας με το πέρας 45 ημερών μετά τον εμβολιασμό παρουσίασαν μικρή συγκέντρωση, παρ' όλα αυτά η συνολική αύξηση των λευκοκυττάρων ήταν αντίστοιχη με τα 0,5mg του ενδομυϊκού εμβολίου. Το χαμηλότερο ποσοστό θνησιμότητας παρατηρήθηκε στην ομάδα ψαριών με τη διπλή δόση (13%), ακολούθησε η ομάδα με τη μία δόση (16%), κατόπιν η ομάδα με το ενδομυϊκό εμβόλιο (20%) και τέλος τα μη ανοσοποιημένα ψάρια (38%). Ως αρνητικό σημείο ήταν η ανίχνευση μικρών ποσοτήτων στα υπολείμματα της τροφής εντός των δεξαμενών γεγονός το οποίο θα μπορούσε να δημιουργήσει σημαντικά προβλήματα στο περιβάλλον.



Εικόνα 6.4 Σχηματική αναπαράσταση του ποσοστού θνησιμότητας των 4 πειραματικών ομάδων

***Recombinant nodavirus vaccine produced in bacteria and administered without purification elicits humoral immunity and protect European sea bass against infection***

Στην εργασία των (*Gonzales-Silvera et al.,2019*) ο πληθυσμός στον οποίο εφαρμόζεται η θεραπεία για την ιογενή εγκεφαλοπάθεια (*Viral Necrosis Virus – NNV*) αποτελείται από υγιή νεαρά άτομα του είδους *Dicentrarchus labrax* μέσου βάρους 11 g. Το ανασυνδυασμένο *NNV (rNNV)* εμβόλιο που κωδικοποιεί την καψιδιακή πρωτεΐνη, την πρωτεΐνη δηλαδή με τις αντιγονικές ιδιότητες, ενσωματώνεται σε βακτηριακό πλασμίδιο *E. coli*. Η διαφορά από πολλές άλλες μελέτες είναι πως δεν έλαβε μέρος ο

καθαρισμός των ιικών πρωτεϊνών, επομένως τα βακτήρια ενεργούν ως όχημα του εμβολίου αλλά και ως ένα βιολογικό ανοσοενισχυτικό. Το εμβόλιο συντίθεται από ολόκληρες καλλιέργειες βακτηρίων για την παραγωγή του *rNNV* (*NNV capsid protein*) που χορηγείται μέσω του στόματος (1010 CFU/gr εμπορικής τροφής) ή μέσω ενδοπεριτοναϊκής έγχυσης (0,1ml από 1011 CFU/ml με λύση των κυττάρων).

Οι ομάδες του πειράματος ορίστηκαν σύμφωνα με τον τρόπο εμβολιασμού. Συγκεκριμένα, για τη δια του στόματος χορήγηση δημιουργήθηκαν 3 ομάδες, η ομάδα ελέγχου που ταΐζεται με εμπορική τροφή (*control*), η ομάδα ελέγχου του oral εμβολίου που τρέφεται με εμπορική τροφή εμπλουτισμένη με το βακτήριο χωρίς όμως το στέλεχος του ιού (*oral control*) και η ομάδα του oral εμβολίου με το στέλεχος του ιού (*oral rNNV*). Η χορηγούμενη τροφή ήταν το 3% της βιομάζας των ψαριών για 3 συνεχόμενες μέρες. Κατ' αντιστοιχία με το oral εμβόλιο ορίζονται και οι ομάδες του ενέσιμου εμβολίου (*ip control* και *ip rNNV*). Η αναμνηστική δόση ακολούθησε 14 ημέρες μετά τον αρχικό εμβολιασμό για τις ομάδες oral και injected. Η μόλυνση με το ομόλογο στέλεχος προκλήθηκε με ενδομυϊκή χορήγηση 30 ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

Τα επίπεδα των αντισωμάτων IgM προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ELISA αφού είχαν προηγηθεί οι απαιτούμενες αιμοληψίες. 30 μέρες μετά τον εμβολιασμό υπήρξε αύξηση της συγκέντρωσης των IgM κυρίως στην ομάδα (*ip rNNV*). Η συγκέντρωση των IgM συνέχισε να αυξάνεται και μετά το challenge με το παθογόνο στέλεχος αλλά αυτή τη φορά τα υψηλότερα επίπεδα τα κατέγραψε η ομάδα (*oral rNNV*). Ο δείκτης RPS ανέρχεται στο 100% για τα *rNNV* εμβόλια (*oral* και *injected*) ενώ και ο δείκτης θνησιμότητας των ομάδων αναφοράς είναι σχετικά μικρός. Οι συγγραφείς διατυπώνουν ως έναν πιθανό παράγοντα του συγκεκριμένου ευρήματος το γεγονός ότι και το control group έλαβε ολόκληρο ή μετά από λύση *E. coli* που πιθανόν να λειτούργησε ως ανοσοδιεγερτικό. Παρ' όλα αυτά και δεδομένου πως δεν παρεμβάλλεται το βήμα του καθαρισμού της πρωτεΐνης, το ανασυνδυασμένο *rNNV* εμβόλιο φαίνεται πολλά υποσχόμενο εξαιτίας της μικρής του οικονομικής επιβάρυνσης και των πολλαπλών οφελών που συνοδεύουν γενικότερα τα oral εμβόλια.

***Assessing the Immune Response of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) after the Oral Intake of Alginate-Encapsulated *Piscirickettsia salmonis* Antigens***

Η εργασία των (Sotomayor-Gerding *et.al.*,2020) επικεντρώθηκε στο παθογόνο *Salmon rickettsial septicaemia* (SRS) το οποίο προκαλεί τις μεγαλύτερες απώλειες στις χιλιανές υδατοκαλλιέργειες σε άτομα του είδους *Salmo salar*. Αξιολογείται η επίδραση των αλγινικών-ενθυλακωμένων αντιγόνων SRS (AEPsA), που ενσωματώνονται στην τροφή για τη δια του στόματος χορήγηση, στη διέγερση του ανοσοβιολογικού συστήματος του σολομού Ατλαντικού (*Salmo salar*). Το στέλεχος *P. salmonis* έχει αδρανοποιηθεί σε διάλυμα φορμαλδεΐδης. Δημιουργούνται τρεις πειραματικές ομάδες. Εξετάζεται η ικανότητα πρόσληψης της τροφής και η σωματική ανάπτυξη των ψαριών κατά τη διάρκεια του πειράματος. Η μέτρηση των αντισωμάτων IgM στο πλάσμα του αίματος γίνεται μέσω της μεθόδου ELISA. Επιπλέον, ελέγχεται η αποτελεσματική ενσωμάτωση των αλγινικών μικροκαψουλών που περιέχουν το αντιγόνο στην τροφή και παράγεται για τον oral εμβολιασμό.

Παράγονται δύο δόσεις του oral εμβολίου, μία χαμηλή δόση, το 30% της συνιστάμενης ενέσιμης δόσης (RID) σε κάθε ψάρι για 10 μέρες και μία υψηλότερης που αντιστοιχεί στο 100% RID σε κάθε ψάρι για 10 ημέρες, όπου η ενέσιμη δόση που συνίσταται από τον παραγωγό ανέρχεται στο 0,1mL (το ενέσιμο εμβόλιο είναι εμπορικό). Συγκεκριμένα, δόθηκε τρεις φορές μεγαλύτερη δόση από το ενέσιμο στην περίπτωση του *oral low dose* και 10 φορές μεγαλύτερη δόση από το ενέσιμο στην περίπτωση του *oral high dose*. Πολυμερικά διαλύματα προετοιμάζονται με την ανάμειξη διαλύματος αντιγόνου, 6,6mL για τη χαμηλή δόση και 20mL για την υψηλή δόση με το ήδη παρασκευασμένο αλγινικό διάλυμα για την παρασκευή αλγινικών-μικροκαψουλών που εμπεριέχουν το αντιγόνο *P. salmonis*. Η τεχνική της μικροενθυλάκωσης που χρησιμοποιήθηκε καλείται αεροδυναμικά υποβοηθούμενο σύστημα εκροής (*aerodynamically assisted jetting system*). Η συγκεκριμένη τεχνική παράγει αλγινικές κάψουλες μέσω ιοντικής πηκτωμάτωσης δίνοντας μικρά ομοιογενή σωματίδια ως προς το μέγεθος και το σχήμα κάτω από απλές και επαναλαμβανόμενες συνθήκες (Arumuganathar, S. *et.al.*,2009) χωρίς την παρέμβαση βιοδραστικών

παραγόντων σε υψηλές θερμοκρασίες ή γενικότερα ακραίες συνθήκες (Jayasinghe, N., 2011). Επιπλέον, πρόκειται για μία οικονομική και εύκολα αναβαθμίσιμη τεχνική.

Η τελική πειραματική τροφή παράγεται μέσω εξοπλισμού κενού επικάλυψης (*vacuum coater*). Η τροφή που παρέχεται σε κάθε πειραματική ομάδα είναι η ίδια από πλευράς θρεπτικών συστατικών. Στη διαδικασία κενού επικάλυψης 4,2kg τροφής προστίθεται στον θάλαμο ανάμειξης μαζί με το μικροενθυλακωμένο εμβόλιο καλυμμένο με ιχθυέλαιο. Ακολούθως, ξεκινά η ανάμειξη. Ο αέρας απομακρύνεται πλήρως από τον θάλαμο ανάμειξης και από τους πόρους της τροφής. Όταν η πίεση φθάσει στα 88 mbar ο αέρας γυρίζει πίσω στον θάλαμο πιέζοντας το έλαιο μέσα στους κενούς πόρους της τροφής. Με αυτόν τον τρόπο ολοκληρώνεται η ενσωμάτωση των μικροκαψουλών στην τροφή. Η ανίχνευση των μικροκαψουλών κατ' επέκταση και η αξιολόγησή τους πραγματοποιείται μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

Η περίοδος εγκλιματισμού των ψαριών ανήλθε στις 2 εβδομάδες πριν ξεκινήσει το πείραμα. Τα άτομα των ψαριών ζυγίζονται κατά μέσο όρο 40.8 ( $\pm 0.4$ ) g και κατανεμήθηκαν σε 12 κυκλικές δεξαμενές. Το πείραμα αποτελούνταν από 3 ομάδες ψαριών (4 δεξαμενές ανά ομάδα, 80 ψάρια ανά δεξαμενή). Η πρώτη ομάδα ήταν η ομάδα αναφοράς (*control*) στην οποία χορηγήθηκε το εμπορικό ενέσιμο εμβόλιο. Στη δεύτερη ομάδα συναντώνται τα ψάρια στα οποία χορηγήθηκε το εμβόλιο από του στόματος με τη χαμηλή δόση και στην τρίτη ομάδα αυτά στα οποία χορηγήθηκε το εμβόλιο με την υψηλή δόση.

Η μη καταναλωθείσα τροφή περισυνελλέγει 10 λεπτά μετά το τάισμα, μέσω ενός αυτόματου συστήματος συλλογής, με σκοπό τον υπολογισμό της ικανότητας πρόσληψης της από τα ψάρια. Τα υπολείμματα τροφής συλλέχθηκαν από τα φίλτρα και αποξηράθηκαν για 24 ώρες στους 70C. Η ποσότητα της καταναλωθείσας τροφής υπολογίστηκε ως η διαφορά μεταξύ της συνολικής αποξηραθείσας τροφής και της αντίστοιχης μη καταναλωθείσας. Η καταγραφή του βάρους και του μήκους των ψαριών πραγματοποιήθηκε μέσω δειγματοληψιών. 8 ψάρια από κάθε δεξαμενή ελήφθησαν στις χρονικές στιγμές 0 degree ημέρες μετά τον εμβολιασμό (DD), 300 DD, 600 DD και 840 DD. Τα διατροφικά αποτελέσματα της σίτισης των ψαριών προσδιορίστηκαν μέσω της αξιολόγησης των δεικτών του βάρους, του μήκους και του δείκτη *specific growth*

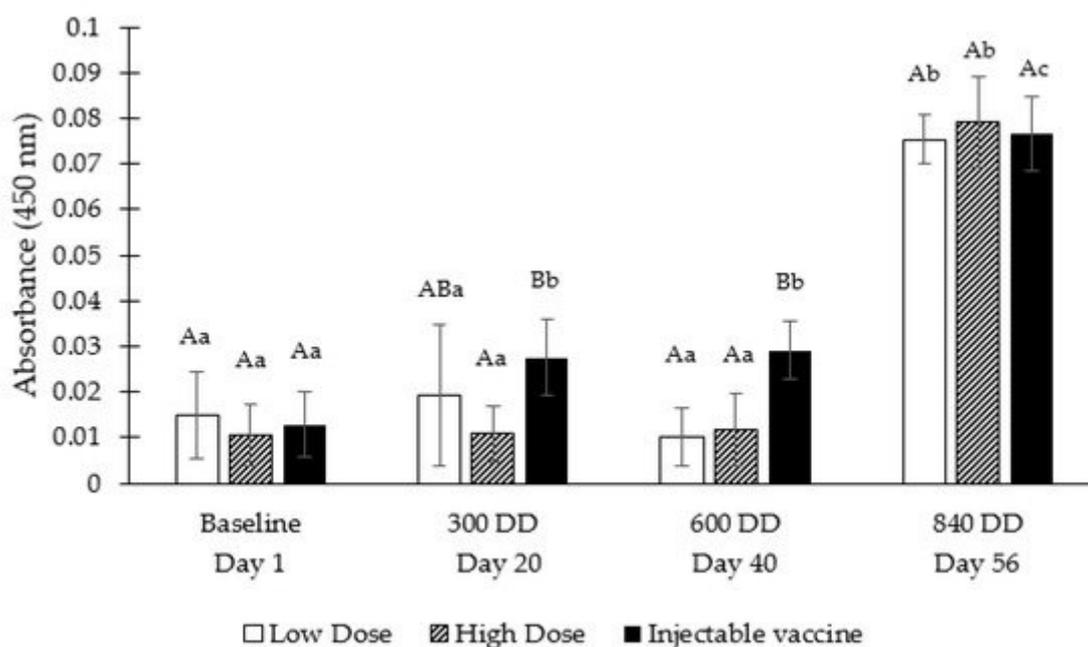
*rate (SGR)*. Ο ίδιος πληθυσμός ψαριών χρησιμοποιήθηκε και για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των αντισωμάτων IgM στο αίμα.

Αποτελεσματικά προέκυψε πως το αεροδυναμικά υποβοηθούμενο σύστημα εκροής κρίθηκε αξιόπιστο στην προετοιμασία αλγινικών μικροκαψουλών με το αντιγόνο αφού αυτά παρήχθησαν σε μικρά τεμάχια (<20μm). Η διαπίστωση προήλθε ύστερα από ενδελεχή έλεγχο των μικροκαψουλών μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Παράλληλα, ελέγχθηκε ο βαθμός ενσωμάτωσης των μικροκαψουλών στην πειραματική τροφή επιβεβαιώνοντας την ορθότητα της διαδικασίας.

Το επόμενο σημείο που εξετάστηκε ήταν η αποδοχή της πειραματικής τροφής από τα ψάρια καθώς επίσης η επίδρασή της στην ανάπτυξη αυτών. Η μη καταναλωθείσα τροφή ήταν μικρότερη του 10% σε όλες τις πειραματικές μονάδες και οι διαφορές μεταξύ τους δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, γεγονός που υποδεικνύει πως η τροφή έγινε αποδεκτή από τον πληθυσμό των ψαριών ανεξαρτήτως ομάδας. Η επίδραση της τροφής εξετάστηκε στο επίπεδο του βάρους και του μήκους των ψαριών. Ορίστηκαν οι προαναφερθείσες χρονικές στιγμές (basal, 300, 600 and 840 DD) για τις τρεις πειραματικές ομάδες. Παρατηρήθηκε η ομάδα με το ενέσιμο εμβόλιο να έχει σημαντικά μεγαλύτερο μέγεθος από τις άλλες δύο μόνο στη χρονική στιγμή 300 DD. Παρ' όλα αυτά, οι διαφορές εντοπίστηκαν μόνο για τη συγκεκριμένη χρονική περίοδο και όχι για τις υπόλοιπες. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ψαριών εντός της ίδιας ομάδας. Σχετικά με το βάρος δεν εντοπίστηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των πειραματικών ομάδων. Συμπερασματικά, δεν παρατηρήθηκε καμία ανωμαλία σχετικά με την πειραματική τροφή κάτι που επιβεβαιώθηκε και από τους δείκτες βάρους και μήκους καθώς και από τον δείκτη *specific growth rate (SGR)* οι οποίοι εφαρμόστηκαν για σκοπούς λεπτομερέστερης ανάλυσης.

Η επίδραση του oral εμβολίου στην παραγωγή αντισωμάτων IgM συγκρίθηκε με την αντίστοιχη του ενέσιμου εμπορικού εμβολίου. Η σύγκριση μεταξύ των πειραματικών ομάδων εντός του αντίστοιχου χρονικού σημείου δειγματοληψίας έδειξε σημαντικές διαφορές στη χρονική στιγμή 300 DD, όπου το *low dose oral* εμβόλιο είχε λιγότερα αντισώματα συγκριτικά με το ενέσιμο καθώς επίσης έδειξε διαφορές και στη

χρονική στιγμή 600 DD όπου και τα δύο oral εμβόλια είχαν σημαντικά λιγότερα αντισώματα από το αντίστοιχο ενέσιμο. Όμως, στη χρονική στιγμή 840 DD που είναι και η τελευταία, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση αντισωμάτων μεταξύ των πειραματικών ομάδων. Εν κατακλείδι, στη χρονική στιγμή 840 DD παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση των αντισωμάτων σε όλες τις ομάδες έναντι του παθογόνου *P. salmonis* επιβεβαιώνοντας την ικανότητα διέγερσης του ανοσοβιολογικού συστήματος και από τα δύο oral εμβόλια στα επίπεδα μάλιστα του αντίστοιχου ενέσιμου.



Εικόνα 6.5 Κατανομή των αντισωμάτων IgM για τις τρεις πειραματικές ομάδες, Oral-low dose, Oral-high dose, Injectable vaccine

## 6.2 Σύνοψη

Αν και η παρούσα εργασία εξαντλεί την ανασκόπηση των oral εμβολίων σε 11 μελέτες, περιοριζόμενη σε είδη αλμυρού νερού και σε όσο το δυνατόν πιο πρόσφατες εργασίες, θα επιχειρήσουμε μία συνολική αποτίμησή τους, όχι με σκοπό να καταλήξουμε σε ένα *de facto* αποτέλεσμα, άλλωστε η πολυπλοκότητα των διαδικασιών και η πληθώρα διαφορετικών παραγόντων/προσεγγίσεων δεν μας το επιτρέπουν, αλλά

για να διαπιστώσουμε εάν τα διαθέσιμα ενδιάμεσα αποτελέσματα των ερευνών οδηγούν προς τη σωστή κατεύθυνση.

Από τις 11 μελέτες που αναφέρονται στην παρούσα εργασία, οι 9 από αυτές έχουν να κάνουν με ενθυλακωμένα εμβόλια με διαφορετική τεχνική ενθυλάκωσης. Όσες από αυτές τις εργασίες προχωρούν σε σύγκριση μεταξύ ενθυλακωμένου και μη εμβολίου, κατέληξαν πως η ενθυλάκωση δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα, σε συνδυασμό πάντα με τις υπόλοιπες παραμέτρους εκάστου πειράματος, τόσο από άποψη RPS όσο και από τη μεριά της ανοσοβιολογικής αντίδρασης. Συμπεράσματα, που επιβεβαιώνουν παλαιότερες μελέτες ως προς την απαραίτητη χρήση της ενθυλάκωσης του αντιγόνου με σκοπό τη σημαντική αύξηση της αποτελεσματικότητας του εμβολίου στη δια του στόματος χορήγηση.

Έξι από τις έντεκα μελέτες αναφέρονται σε DNA εμβόλια ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, τέσσερις από αυτές σε εμβόλια ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και απομένει μία μελέτη στην οποία δεν αποσαφηνίζεται ο τύπος του εμβολίου από τους συγγραφείς. Σε γενικές γραμμές, και εάν μας επιτραπεί μία εκτίμηση σε ένα μικρό δείγμα εργασιών, δεν προκύπτει κάποιο συμπέρασμα πως τα εμβόλια ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης υπερέχουν από τα αντίστοιχα DNA ή και το αντίστροφο.

Τέσσερις από τις έντεκα μελέτες συγκρίνουν oral με oral εμβόλια (είτε είναι εμπορικά είτε παράγονται επιτόπου) με τον δείκτη RPS, όπου υπολογίζεται, να κυμαίνεται από το 45% έως και το 78%. Παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αύξηση των αντισωμάτων IgM εκτός από μία περίπτωση όπου η αύξηση δεν φαίνεται να συσχετίζεται στατιστικά σημαντικά με τη φόρμουλα των oral εμβολίων. Σημαντικό εύρημα σε μία από αυτές είναι η διέγερση των αντισωμάτων IgT στον πεπτικό σωλήνα. Γενικά, οι υπόλοιπες μελέτες δεν αναφέρονται στα αντισώματα IgT του βλεννογόνου των τελεόστεων ψαριών. Εν συνεχεία, σε μία από τις 11 μελέτες συγκρίνεται ένα εμβόλιο ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης το οποίο χορηγείται μία με την oral μέθοδο και μία με τη μέθοδο της εμβάπτισης. Σε όρους RPS η oral χορήγηση υπερισχύει της εμβάπτισης αλλά σε όρους παραγωγής αντισωμάτων δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Στις μελέτες που απομένουν συγκρίνονται oral με injection εμβόλια (είτε ενδομυϊκά είτε ενδοπεριτοναϊκά) και αποτελούν ίσως το πιο

ενδιαφέρον κομμάτι αφού αποτελεσματικά φαίνεται πως η oral διαδικασία είτε υπερσχύει είτε δεν διαφέρει σημαντικά από την ενέσιμη μέθοδο σε όρους ποσοστού θνησιμότητας ή διέγερσης/παραγωγής αντισωμάτων. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σημειώσουμε πως σε δύο μόνο από προαναφερθείσες μελέτες η δόση του oral εμβολίου ήταν ισόποση του ενέσιμου, στις υπόλοιπες η δόση ήταν σημαντικά μεγαλύτερη, γεγονός που θα μπορούσε να καταγραφεί ως ένα ακόμα σημαντικό προς επίλυση ζήτημα, μιας και δεν μας αποσαφηνίζεται το κόστος των επιπλέον δόσεων για τα oral εμβόλια.

Ένα ακόμα ενδιαφέρον στοιχείο των μελετών έγκειται στον τρόπο εισαγωγής του συνήθως ενθυλακωμένου εμβολίου στην τροφή. Φαίνεται πως κατέχει σημαίνοντα ρόλο το ποσοστό απορρόφησης της δόσης του εμβολίου στην τροφή ώστε να μην χάνεται μέρος της αρχικά ορισθείσας δόσης. Σε κάποιες από τις μελέτες ως τεχνική εισαγωγής του εμβολίου στην τροφή αναφέρεται η λυοφιλοποίηση της. Συγκεκριμένα αφυδατώνεται μέχρι να αποκτήσει το μισό της βάρους, ακολούθως αποξηραίνεται, θρυμματίζεται και αναμειγνύεται με τις μικροκάψουλες που περιέχουν το εμβόλιο. Η διαδικασία συνήθως ολοκληρώνεται με τον ψεκασμό μίας μικρής ποσότητας ελαίου ώστε να δημιουργηθεί ένα προστατευτικό φιλμ γύρω από την τροφή. Πέρα από τη λυοφιλοποίηση αναφέρεται και η τεχνική της ενσωμάτωσης μέσω εξοπλισμού κενού επικάλυψης (*vacuum coater*), όπου εξέρχεται ο αέρας από την τροφή, ψεκάζεται με το εμβόλιο, ο αέρας επανέρχεται σε υψηλή πίεση αναγκάζοντας το αντιγόνο να εισέλθει στους πόρους της τροφής. Με τη δεύτερη μέθοδο εξασφαλίζεται η ομοιόμορφη κατανομή του εμβολίου στην τροφή και η αποφυγή της υποβάθμισής του στον πεπτικό σωλήνα. Το γεγονός της σημαντικότητας της πλήρους απορρόφησης της αρχικής υπολογισθείσας δόσης του εμβολίου από την τροφή καταδεικνύεται από τον υπολογισμό της ικανότητας πρόσληψης της τροφής από τα ψάρια που αποτελούν μέλη διαφορετικών πειραματικών μονάδων. Συγκεκριμένα, συναντήσαμε σε μία από τις 11 μελέτες τον υπολογισμό της ικανότητας πρόσληψης της τροφής μέσω της περισυλλογής των υπολειμμάτων τροφής με το εμβόλιο με το πέρας της εμβολιαστικής περιόδου. Συνεπώς, για την πληρότητα και την ορθότητα του πειράματος δεν χρειαζόμαστε μόνο ένα ισόποσο ή τουλάχιστον ισόποσο ποσοστό κατανάλωσης της

τροφής από τις επιμέρους ομάδες αλλά και αυτή να περιέχει την αρχική ορισθείσα δόση του εμβολίου.

Σε επίπεδο εκτρεφόμενων ειδών, δύο μελέτες, από τους ίδιους συγγραφείς, αναφέρονται στην τσιπούρα και είναι ενθαρρυντικές ως προς τη χρησιμοποίηση της oral μεθόδου. Για το λαβράκι καταγράφονται 3 μελέτες όπου στις δύο από αυτές γίνεται σύγκριση oral με oral εμβόλιο, όπου και καταγράφεται σημαντική βελτίωση του δείκτη RPS στα ενισχυμένα oral εμβόλια και των αντισωμάτων *IgT* (στη μία από τις δύο), αλλά δεν εντοπίζεται παραγωγή των αντισωμάτων *IgM* σε καμία από αυτές. Στην τρίτη γίνεται σύγκριση μεταξύ oral και εμπορικού ενέσιμου όπου τα αποτελέσματά τους δεν διαφέρουν σημαντικά. Στον σολομό αναφέρονται 6 μελέτες από αυτές που έχουμε ήδη περιγράψει. Οι τρεις από τις έξι, συγκρίνουν oral με ενισχυμένα oral εμβόλια, με σημαντικά θετικά αποτελέσματα σύμφωνα με τον δείκτη RPS αλλά με τα αποτελέσματά τους ως προς τη διέγερση της χυμικής και κυτταρικής ανοσίας να ποικίλλουν. Δύο από τις έξι συγκρίνουν oral με ενέσιμα εμβόλια, με την oral διαδικασία να υπερέχει ή στη χειρότερη να πετυχαίνει εφάμιλλα αποτελέσματα έναντι του ενέσιμου εμβολίου. Η τελευταία μελέτη συγκρίνει το oral εμβόλιο με το αντίστοιχο της εμβάπτισης, με καλύτερα αποτελέσματα για το πρώτο.

Κλείνοντας θα επανέλθουμε στο αρχικό μας ερώτημα, δηλαδή στο πόσο συγκρίσιμες είναι οι προαναφερθείσες μελέτες μεταξύ τους. Εκ πρώτης και εάν λάβουμε υπόψη το γεγονός ότι έχουμε να κάνουμε με διαφορετικούς παθογόνους μικροοργανισμούς, διαφορετικές τεχνικές ενθυλάκωσης του εμβολίου σε μικροκάψουλες, διαφορετικές τεχνικές ενσωμάτωσης του εκάστοτε εμβολίου στην τροφή, διαφορετικά ανοσοενισχυτικά, διαφορετικά εκτρεφόμενα είδη, σε διαφορετικές φυσικές συνθήκες και γεωγραφικά μέρη, η απάντηση πιθανών να ήταν αρνητική, κοινώς δεν υπάρχει η «apples to apples» σύγκριση. Όμως, παρά τις σημαντικές διαφορές φαίνεται πως τα αποτελέσματα συμπίπτουν και υποστηρίζουν πως η μέθοδος χορήγησης του εμβολίου από το στόμα, δοκιμασμένη σε τόσο διαφορετικές συνθήκες δίνει ενθαρρυντικά αποτελέσματα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η επιστημονική κοινότητα ορθώς στρέφεται προς τη συγκεκριμένη μέθοδο.

## 7. DISCUSSION

Η oral μέθοδος χορήγησης του εμβολίου όπως ήδη έχουμε αναφέρει έχει πολλά πλεονεκτήματα με κυριότερο το γεγονός ότι δεν υποβάλλει τα εκτρεφόμενα είδη στη στρεσογόνο διαδικασία της ενέσιμης μεθόδου. Παρ' όλο που τα μειονεκτήματά της αρχικά ήταν πολλά, εξομαλύνθηκαν μέσω συγκεκριμένων τεχνικών και πλέον η μέθοδος καθίσταται εφαρμόσιμη και ιδιαίτερα ελκυστική.

- Η υποβάθμιση του εμβολίου στην πεπτική οδό των ψαριών αντιμετωπίστηκε με την ενθυλάκωσή του.
- Η ανομοιόμορφη κατανομή του εμβολίου στην τροφή αντιμετωπίστηκε με την εφαρμογή διαφόρων τεχνικών ενθυλάκωσης ώστε τελικά να επιτευχθεί η ενσωμάτωση του στην τροφή μέσω των πόρων της.
- Ενισχύεται η αντιγονοπαρουσίαση χρησιμοποιώντας διάφορα ανοσοενισχυτικά.
- Καλλιεργούνται σε διάφορα συστήματα έκφρασης (*E.coli*, *P.Pastoris*) τα εκάστοτε αντιγόνα.
- Κατορθώθηκε να οδηγηθούν τα αντιγόνα σε ιστούς στόχους χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους φορείς, οι οποίοι μπορεί να έχουν διπλή αποστολή, δηλαδή να έχουν και ανοσοδιεγερτική ιδιότητα.

Κλείνοντας, παραθέτουμε πολύ συνοπτικά τρεις τεχνικές που βρίσκονται σε εξέλιξη και θα μπορούσαν να μας απασχολήσουν έντονα στο κοντινό μέλλον με εφαρμογή στον oral εμβολιασμό. Η πρώτη σχετίζεται με τα διαγονιδιακά φυτά (*transgenic plants*) για τη διέγερση της ανοσοβιολογικής αντίδρασης, η δεύτερη με τα μονοκλωνικά αντισώματα και η τελευταία με τις βιο-μεμβράνες (*biofilms*).

- Για την περίπτωση των διαγονιδιακών φυτών, ολόκληρα φυτά ή κύτταρα/ιστοί τους καλλιεργούνται *in vitro* και χρησιμοποιούνται για την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Η *plant-based* πλατφόρμα είναι φιλική προς το περιβάλλον και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δια του στόματος χορήγηση του εμβολίου χωρίς να απαιτούνται πολύπλοκα βιοαντιδραστήρια και συστήματα έκφρασης όπως η *E. coli*, δεν υπάρχει ο κίνδυνος επιστροφής του

παθογόνου στην αρχική του λοιμογόνο κατάσταση όπως συμβαίνει στα *live vaccines* και ανεπιθύμητα τοξικά στοιχεία όπως ενδεχομένως εμφανίζουν οι ζυμομύκητες, δεν έχουν εντοπιστεί στα διαγονιδιακά φυτά.

- Άλλη μία ενδιαφέρουσα περίπτωση είναι τα μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία μόλις τώρα εφαρμόζονται στους ανθρώπους εν καιρώ πανδημίας με σημαντική επιτυχία.
- Τέλος υπάρχουν τα *biofilms*, οι βιο-μεμβράνες ορίζονται ως μικροβιακές κοινότητες που εγκυστεύονται σε μία προστατευτική συγκολλητική μήτρα. Έχουν χρησιμοποιηθεί ως μελέτες εμβολίων όπου η προστατευτική επικάλυψη που δημιουργείται από τις βιο-μεμβράνες εμποδίζει την υποβάθμιση των αντιγόνων στον γαστρεντερικό σωλήνα.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams A, Thompson KD, Roberts RJ (1997) Fish vaccines. UN. Rome. Food and Agriculture Organization.
- Anderson DP, Merchant B, Bixon OW, Schott CF, Lizzio EF (1983) Flush exposure and injection immunisation of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) to selected DNP conjugates. *Developmental and Comparative Immunology*, 7: 261-268.
- Arumuganathar, S.; Suter, N.; Walzel, P.; Jayasinghe, S.N. Review. Aerodynamically assisted jetting and threading for processing concentrated suspensions containing advanced structural, functional and biological materials. *Biotechnol. J.* 2009, 4, 64–72.
- ATHANASSOPOULOU (Φ. ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΥ), F., & KARAGOUNI (ΚΑΡΑΓΚΟΥΝΗ Ε.), E. (2017). Rickettsia-like organisms (R.L.O.) infections of fin-fish. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 55(2), 165-173. doi:<https://doi.org/10.12681/jhvms.15188>
- Austin B (1984) The future of bacterial fish vaccines. *Vaccine*, 2: 249- 254.
- Azad IS, Shankar KM, Mohan CV, Kalita B (2000) Update and processing of biofilm and free-cell vaccines of *Aeromonas hydrophila* in Indian major carps and common carp following oral vaccination-antigen localization by a monoclonal antibody. *Dis Aquat Organ*, 43:103-108.
- Barnes, A. Prevention of disease by vaccination. In *Aquaculture: Farming. Aquatic. Animals and Plants*, 3rd ed.; Lucas, J.S., Southgate, P.C., Tucker, C.S., Eds.; John Wiley & Sons Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2019; pp. 249–272.
- Baxter, D. Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. *Occup. Med.* 2007, 57, 552–556.
- Biering, E.; Villoing, S.; Sommerset, I.; Christie, K.E. Update on viral vaccines for fish. *Dev. Biol.* 2005, 121, 97–113.
- Bricknell, I.R.; Bowden, T.J.; Lomax, J.; Ellis, A.E. Antibody response and protection of Atlantic salmon (*Salmo salar*) immunised with an extracellular polysaccharide of *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol.* 1997, 7, 1–16.
- Caruffo M, Maturana C, Kambalapally S, Larenas J, Tobar JA. Protective oral vaccination against infectious salmon anaemia virus in *Salmo salar*. *Fish Shellfish Immunol.* 2016 Jul;54:54-9. doi: 10.1016/j.fsi.2016.03.009. Epub 2016 Mar 16. PMID: 26994669.
- Caruffo M, Vidal S, Santis L, Siel D, Pérez O, Huenchullan PR, Sáenz L. Effectiveness of a proteoliposome-based vaccine against salmonid rickettsial septicaemia in *Oncorhynchus mykiss*. *Vet Res.* 2021 Aug 23;52(1):111. doi: 10.1186/s13567-021-00982-2. PMID: 34425904; PMCID: PMC8382212.
- Cho, S.Y.; Kim, H.J.; Lan, N.T.; Han, H.J.; Lee, D.C.; Hwang, J.Y.; Kwon, M.G.; Kang, B.K.; Han, S.Y.; Moon, H.; et al. Oral vaccination through voluntary consumption of the convict grouper *Epinephelus septemfasciatus* with yeast producing the capsid protein of red-spotted grouper nervous necrosis virus. *Vet. Microbiol.* 2017, 204, 159–164.
- Desmettre, P.; Martinod, S. Research and development. In *Veterinary Vaccinology*; Pastoret, P.P., Blancou, J., Vannier, P., Verschueren, C., Eds.; Elsevier Press: Amsterdam, The Netherlands, 1997; pp. 175–194.
- Dos Santos NM, Taverne-Thiele JJ, Barnes AC, van Muiswinkel WB, Ellis AE, Rombout JH (2001) The gill is a major organ for antibody secreting cell production following direct immersion of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) in a *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* bacterin: an ontogenetic study. *Fish Shellfish Immunol*, 11(1): 65-74.
- E. Rimstad, S. Mjaaland, Infectious salmon anaemia virus, *Apmis* 110 (4) (2002) 273-282.
- Ellis AE (1985) Development offish vaccines: strategies and future considerations. In: Ellis AE (eds.), *Fish and shellfish Pathology*. Academic Press London, 41-54.
- Ellis AE (1988) *Fish Vaccination*. Academic Press London, 250:1-46.

- Ellis AE (1997) Immunization with bacterial antigens: furunculosis. In: Gudding R, Lillehaug A, Midtlyng PJ, Brown F (Eds.), *Developments in Biological Standardization* Basel Karger, 473: 107-116.
- Evelyn TPT (1997) A historical review of fish vaccinology. In: Gudding R, Lillehaug A, Midtlyng PJ, Brown F (Eds.), *Fish Vaccinology*. Dev Biol Stand Basel. Switzerland Karger Publishers, 1-12.
- Fender DC, Amend DF (1978) Hyperosmotic infiltration: factors influencing uptake of bovine serum albumin by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Fish Res Board Can*, 35:871-874.
- Galindo-Villegas J, Mulero I, García-Alcazar A, Muñoz I, Peñalver-Mellado M, Streitenberger S, Scapigliati G, Meseguer J, Mulero V. Recombinant TNF $\alpha$  as oral vaccine adjuvant protects European sea bass against vibriosis: insights into the role of the CCL25/CCR9 axis. *Fish Shellfish Immunol*. 2013 Oct;35(4):1260-71. doi: 10.1016/j.fsi.2013.07.046. Epub 2013 Aug 9. PMID: 23932985.
- Ghosh B, Nguyen TD, Crosbie PBB, Nowak BF, Bridle AR. Oral vaccination of first-feeding Atlantic salmon, *Salmo salar* L., confers greater protection against yersiniosis than immersion vaccination. *Vaccine*. 2016 Jan 27;34(5):599-608. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.12.044. Epub 2015 Dec 24. PMID: 26724544.
- Gonzalez-Silvera D, Guardiola FA, Espinosa C, Chaves-Pozo E, Esteban MÁ, Cuesta A. Recombinant nodavirus vaccine produced in bacteria and administered without purification elicits humoral immunity and protects European sea bass against infection. *Fish Shellfish Immunol*. 2019 May;88:458-463. doi: 10.1016/j.fsi.2019.03.013. Epub 2019 Mar 13. PMID: 30877059.
- Gudding R, Lillehaug A, Evensen O (1999) Recent developments in fish vaccinology. *Vet Immunol Immunopathol*, 72(1-2): 203-212.
- Holvold LB, Myhr AI, Dalmo RA. Strategies and hurdles using DNA vaccines to fish. *Vet Res*. (2014) 45:21.
- Home MT (1997) Technical aspects of the administration of vaccines. In: Gudding R, Lillehaug A, Midtlyng PJ, Brown F, (Eds.), *Developments in Biological Standardization* Basel Karger, 79-89.
- Ire T, Watarai S, Iwasaki T, Kodama H (2005) Protection against experimental *Aeromonas salmonicida* infection in carp by oral immunization with bacterial antigen entrapped in liposomes. *Fish Shellfish Immunol*, 18: 235-242.
- Jayasinghe, N. Review. Biojets in regenerative biology & medicine. *Mater. Today* 2011, 14, 202–211.
- K. Falk, V. Aspehaug, R. Vlasak, C. Endresen, Identification and characterization of viral structural proteins of infectious salmon anemia virus, *J. Virol*. 78 (6) (March 15, 2004) 3063-3071.
- Kurath, G. Biotechnology and DNA vaccines for aquatic animals. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Des. Epizoot.* 2008, 27, 175–196.
- Levine, M.M.; Sztein, M.B. Vaccine development strategies for improving immunization: The role of modern immunology. *Nat. Immunol*. 2004, 5, 460.
- Lillehaug A, Ramstad A, Baekken K, Reitan LJ (1993) Protective immunity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) vaccinated at different water temperatures. *Fish Shellfish Immunol*, 3:143-156
- Lobb CJ (1987) Secretory immunity induced in catfish, *Ictalurus punctatus*, following bath immunization. *Dev Comp Immunol*, 11(4): 727-738.
- Lumsden JS, Ostland VE, Byrne PJ, Ferguson HW (1993) Detection of a distinct gill-surface antibody response following horizontal infection and bath challenge of brook trout *Salvelinus fontinalis* with *Flavobacterium branchiophilum*, the causative agent of bacterial gill disease. *Dis Aquat Organ*, 16(1): 21-27.
- M. Dadar, K. Dhama, V. N. Vakharia et al., "Advances in Aquaculture Vaccines Against Fish Pathogens: Global Status and Current Trends," *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, vol. 25, no. 3, pp. 184–217, 2016.

- M. Sáez, A. Vizcaíno, F. Alarcón, T. Martínez Comparison of lacZ reporter gene expression in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) following oral or intramuscular administration of plasmid DNA in chitosan nanoparticles *Aquaculture*, 474 (2017), pp. 1-10
- Maurice S, Nussinovitch A, Jaffe N, Shoseyov O, Gertler A (2004) Oral immunization of *Carassius auratus* with modified recombinant Alayer proteins entrapped in alginate beads. *Vaccine*, 23:450-459.
- Midtlyng PJ, Reitan LJ, Lillehaug A, Ramstad A (1996a) Protection, immune response and side effects in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) vaccinated against furunculosis by different procedures. *Fish Shellfish Immunology*, 6: 599-613.
- Nakanishi T, Ototake M (1997) Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. In: Gudding R, Lillehaug A, Midtlyng PJ, Brown F, (Eds.), *Developments in Biological Standardization* Basel Karger, 59-68.
- ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ (Π. ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ), Π., ΒΙΤΧΑΒΑ (Κ. ΜΠΙΤΧΑΒΑ), Κ., ΤΖΙΡΟΝΙ (Ε. ΤΖΙΡΩΝΗ), Ε., & ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΥ (Φ. ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΥ), Φ. (2017). Fish vaccination. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 59(4), 308-319. doi:<https://doi.org/10.12681/jhvms.14965>
- Pasquale, A.D.; Preiss, S.; Silva, F.T.; Garçon, N. Vaccine adjuvants: From 1920 to 2015 and beyond. *Vaccines* 2015, 3, 320–343.
- Press CMcL, Lillehaug A (1995) Vaccination in European salmonid aquaculture: a review of practices and prospects. *Br Vet J*, 151: 45- 69.
- Reyes M, Ramírez C, Ñancuqueo I, Villegas R, Schaffeld G, Kriman L, Gonzalez J, Oyarzun P. A novel "in-feed" delivery platform applied for oral DNA vaccination against IPNV enables high protection in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Vaccine*. 2017 Jan 23;35(4):626-632. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.12.013. Epub 2016 Dec 21. PMID: 28012776.
- Rivas-Aravena A, Fuentes Y, Cartagena J, Brito T, Poggio V, La Torre J, Mendoza H, Gonzalez-Nilo F, Sandino AM, Spencer E. Development of a nanoparticle-based oral vaccine for Atlantic salmon against ISAV using an alphavirus replicon as adjuvant. *Fish Shellfish Immunol*. 2015 Jul;45(1):157-66. doi: 10.1016/j.fsi.2015.03.033. Epub 2015 Apr 7. PMID: 25862072.
- Rosenthal, J.A.; Chen, L.; Baker, J.L.; Putnam, D.; DeLisa, M.P. Pathogen-like particles: Biomimetic vaccine carriers engineered at the nanoscale. *Curr. Opin. Biotechnol*. 2014, 28, 51–58.
- S.C. Clouthier, T. Rector, N.E. Brown, E.D. Anderson, Genomic organization of infectious salmon anaemia virus, *J. Gen. Virol*. 83 (Pt 2) (2002 Feb) 421-428.
- Sáez MI, Vizcaíno AJ, Alarcón FJ, Martínez TF. Feed pellets containing chitosan nanoparticles as plasmid DNA oral delivery system for fish: In vivo assessment in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Fish Shellfish Immunol*. 2018 Sep;80:458-466. doi: 10.1016/j.fsi.2018.05.055. Epub 2018 May 30. PMID: 29859312.
- Smith PD (1988) Vaccination against vibriosis, in Ellis AE (Ed.), *Fish vaccination*. London Academic Press, 57-85.
- Sotomayor-Gerding D, Troncoso JM, Pino A, Almendras F, Diaz MR. Assessing the Immune Response of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) after the Oral Intake of Alginate-Encapsulated *Piscirickettsia salmonis* Antigens. *Vaccines (Basel)*. 2020 Aug 11;8(3):450. doi: 10.3390/vaccines8030450. PMID: 32796725; PMCID: PMC7565443.
- Sudheesh, P.S.; Cain, K.D. Prospects and challenges of developing and commercializing immersion vaccines for aquaculture. *Int. Biol. Rev*. 2017, 1, 1–20.
- Tatner MF (1987) The quantitative relationship between vaccine dilution, length of immersion time and antigen uptake, using a radiolabelled *Aeromonas salmonicida* bath in direct immersion experiments with rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*, 62: 173-85.
- Tatner MF, Manning MJ (1983) The ontogeny of cellular immunity in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Richardson, in relation to the stage of development of the lymphoid organs. *Dev Comp Immunol*, 7(1): 69-75.

- Tlaxca, J.L.; Ellis, S.; Remmele, R.L., Jr. Live attenuated and inactivated viral vaccine formulation and nasal delivery: Potential and challenges. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015, 93, 56–78.
- Tobar I, Arancibia S, Torres C, Vera V, Soto P, Carrasco C, Alvarado M, Neira E, Arcos S, Tobar JA. Successive Oral Immunizations Against *Piscirickettsia Salmonis* and Infectious Salmon Anemia Virus are Required to Maintain a Long-Term Protection in Farmed Salmonids. *Front Immunol.* 2015 May 27;6:244. doi: 10.3389/fimmu.2015.00244. PMID: 26074916; PMCID: PMC4445318.
- Tobar., I.; Arancibia., S.; Torres., C.; Vera., V.; Soto., P.; Carrasco., C.; Alvarado, M.; Neira, E.; Arcos, S.; Tobar, J.A. Successive oral immunizations against *Piscirickettsia salmonis* and infectious salmon anemia virus are required to maintain a long-term protection in farmed salmonids. *Front. Immunol.* 2015, 6, 244.
- Ulmer, J.B.; Geall, A.J. Recent innovations in mRNA vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* 2016, 41, 18–22.
- Ulmer, J.B.; Mason, P.W.; Geall, A.; Mandl, C.W. RNA-based vaccines. *Vaccine* 2012, 30, 4414–4418.
- Valero Y, Awad E, Buonocore F, Arizcun M, Esteban MÁ, Meseguer J, Chaves-Pozo E, Cuesta A. An oral chitosan DNA vaccine against nodavirus improves transcription of cell-mediated cytotoxicity and interferon genes in the European sea bass juveniles gut and survival upon infection. *Dev Comp Immunol.* 2016 Dec;65:64-72. doi: 10.1016/j.dci.2016.06.021. Epub 2016 Jun 28. PMID: 27370973.
- Valero, Y.; López-Vázquez, C.; Souto, S.; Oliveira, J.G.; Cuesta, A.; Bandín, I. Differential Nervous Necrosis Virus (NNV) Replication in Five Putative Susceptible Cell Lines. *Pathogens* 2021, 10, 1565. <https://doi.org/10.3390/pathogens10121565>
- Weiner, D.B. DNA vaccines: Crossing a line in the sand introduction to special issue. *Vaccine* 2008, 26, 5073.
- Zapata AG, Torroba M, Varas A, Jimenez AV (1997) Immunity in fish larvae. In: Gudding R, Lillehaug A, Midtlyng PJ, Brown F, (Eds.), *Developments in Biological Standardization* Basel Karger, 23-32